30 h

22102047691

Med
K11577

ALLGEMEINE CHEMIE
DER ENZYME.

Digitized by the Internet Archive
in 2016

https://archive.org/details/b28082485

Allgemeine Chemie der Enzyme.

VON

HANS EULER,

PROFESSOR DER CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STOCKHOLM.

MIT 4 TEXTFIGUREN.

CHEMICAL SOCIETY
CANCELLED
BURLINGTON HOUSE, W.

WIESBADEN.

VERLAG VON J. F. BERGMANN.

1910.

Nachdruck verboten.

Übersetzungsrecht in allen Sprachen vorbehalten.

WELLCOME INSTITUTE LIBRARY

Coll. wel[illegible]mec

Call No. QU

Vorwort.

Wie im Titel dieses Buches angedeutet ist, hat der Verf. versucht, die wichtigeren Tatsachen der Enzymologie unter allgemeinen Gesichtspunkten zusammenzufassen und sie also, soweit möglich, in das Lehrgebäude der allgemeinen und physikalischen Chemie einzuordnen. Es bestand somit nicht die Absicht, eine Zusammenstellung alles dessen zu geben, was wir über Enzyme wissen, um so weniger, als schon eine Anzahl derartiger Kompendien vorliegt, unter welchen dasjenige von C. Oppenheimer (Die Fermente und ihre Wirkungen. 2. Aufl. Leipzig 1903) bereits eine allgemeine Verbreitung besitzt.

Man kann vielleicht fragen, ob der rechte Zeitpunkt für die Darstellung der physikalischen Chemie der Enzyme bereits gekommen ist. Diese Frage hat sich der Verf. mit „ja“ beantwortet, obwohl offenbar grosse Gebiete und wichtige Probleme des Gebietes noch vollständig unbearbeitet sind. Auf eine Periode, in welcher die Herbeischaffung von Tatsachen die wesentlichste Aufgabe war, folgten zunächst die Versuche, auf das ziemlich rohe und unvollständige Beobachtungsmaterial die Gesetze der theoretischen Chemie anzuwenden. Die Abweichungen von der Theorie waren scheinbar gross, die Besonderheiten der enzymatischen Reaktionen schienen zahlreich. Erst in allerletzter Zeit hat sich dann das Bedürfnis nach einer experimentellen Revision der quantitativen Angaben fühlbar gemacht. Die Versuchsmethodik wird verbessert, die an den Reaktionen mitwirkenden Faktoren werden klarer erkannt und vollständiger berücksichtigt, und so zeigt es sich allmählich, dass die exaktesten und umfassendsten Untersuchungen zu Resultaten führen, welche sich den Forderungen der physikalisch-chemischen Theorien aufs beste anschliessen. In diesem Zeitpunkt der konsequenten Durcharbeitung der Enzymologie ist vielleicht eine Übersicht wie die vorliegende gerechtfertigt, und der Verf. hat sich deshalb entschlossen, die beiden Referate über das vorliegende Thema, welche in den Jahren 1907 und 1910 in den „Ergebnissen der Physiologie“ erschienen sind, umgearbeitet in Buchform erscheinen zu lassen, trotz der vielen Lücken, welche eine solche Darstellung zweifellos noch aufweisen muss.

Ist diese Monographie in erster Linie als ein Hülfsbuch der wissenschaftlichen enzymologischen Forschung gedacht, so hofft der Verfasser doch dass es auch denjenigen, welche sich mit enzymologischen Reaktionen zu praktischen Zwecken beschäftigen — sei es in der Klinik, sei es im technischen Betrieb — von Nutzen sein kann. Das Verständnis für die Dynamik der Enzymreaktionen ist für die rationelle Bestimmung der Enzymwirkungen sei es des Pepsins im Magensaft, sei es der Diastasen im Malz, unerlässlich, und die Theorie wird auch hier für den Arzt und Techniker von praktischem Wert sein.

Als Anhang ist dem Buch eine kurze Sammlung von Arbeitsmethoden beigegeben, besonders in Rücksicht auf alle diejenigen, welchen die Originalliteratur nicht unmittelbar zugänglich ist. Besonders dürften vielen die Tabellen zu der ausgezeichneten Zuckerbestimmungsmethode von G. Bertrand willkommen sein, welche mit der freundlichen Erlaubnis dieses Forschers hier zum Abdruck gelangt sind.

An der Ausarbeitung dieser Monographie hat sich Frl. Beth af Ugglas, Assistent an der biochemischen Abteilung des hiesigen chemischen Laboratoriums, beteiligt; ich spreche ihr hier meinen aufrichtigen Dank aus.

Stockholm, im Januar 1910.

H. Euler.

Inhalt.

		Seite
	Einleitung	1
Kap. I.	**Spezielle Chemie der Enzyme**	4
	Nomenklatur	4
	Systematik	4
	Der Wirkungsbereich der Enzyme. Ihre Darstellung und Reinigung	6
	Esterasen	8
	Die Enzyme der höheren Kohlehydrate	10
	Die Enzyme der Polysaccharide	14
	Andere glukosidspaltende Enzyme	19
	Invertase	21
	Phytase	23
	Pektase	23
	Pektinase	23
	Carbamasen	24
	Pepsin	24
	Trypsin	24
	Erepsin	27
	Proteolytische Enzyme der Pflanzen	28
	Nukleasen	29
	Urease	30
	Desamidasen	31
	Koagulierende Enzyme	32
	Thrombin, Fibrinferment	34
	Gärungsenzyme	35
	Enzyme der alkoholischen Gärung	36
	Milchsäurebakterien-Zymase	39
	Oxydasen	40
	Peroxydasen	43
	Tyrosinase	45
	Katalasen	46
	Reduzierende Enzyme	47
	Anhang	47
Kap. II.	**Physikalische Eigenschaften der Enzyme**	49
	Feste, neutrale Adsorptionsmittel	56
Kap. III.	**Aktivatoren (Ko-Enzyme), Paralysatoren und Gifte**	64
	Kinasen unbekannter Zusammensetzung	65
	Spezielle organische Aktivatoren	65

Seite

Säuren, Basen und Neutralsalze 66
Schutzstoffe 82
Hemmungskörper (Paralysatoren) 82
Anorganische Salze 83
Organische Gifte und Hemmungskörper 84

Kap. IV. **Chemische Dynamik der Enzymreaktionen** 88
Die theoretischen Grundlagen der enzymatischen Dynamik 89
Katalyse 91
Umkehrbare Reaktionen 98
Experimentelle Ergebnisse über den Verlauf enzymatischer Reaktionen . . . 105
Esterasen und Lipasen 105
Amylase 112
Invertase 114
Maltase 119
Laktase 120
Emulsin 122
Proteolytische Enzyme 125
Labenzym (Chymosin) 145
Fibrinferment 149
Zymase 149
Katalasen 154
Oxydasen 157
Aldehydasen 158
Peroxydasen 160
Tyrosinase 165

Kap. V. **Einfluss der Temperatur und Strahlung auf enzymatische Reaktionen** 167
Einfluss der Bestrahlung 177

Kap. VI. **Chemische Statik bei Enzymreaktionen** 182

Kap. VII. **Enzymatische Synthesen** 188

Kap. VIII. **Die Spezifität der Enzymwirkungen** 199
Schluss 207

Anhang. **Arbeitsmethoden** 210
Proteolytische Enzyme 217
Autorenverzeichnis 231
Sachverzeichnis 236
Berichtigungen und Nachträge 239

Einleitung.

Als Enzyme oder ungeformte Fermente bezeichnet man dem Tier- oder Pflanzenreich angehörende Stoffe von unbekannter Zusammensetzung und Konstitution, welche zunächst im Organismus, sodann aber auch unabhängig von dem Organ bezw. der Zelle, welcher sie entstammen, chemische Reaktionen beschleunigen. Der Begriff Enzym fällt hiernach unter den viel umfassenderen Begriff Katalysator.

Unter Katalysator verstehen wir einen Stoff, der, ohne selbst verbraucht zu werden, bezw. ohne in den Endprodukten der Reaktion zu erscheinen, die Geschwindigkeit ändert, mit welcher ein chemisches System seinem Gleichgewicht zustrebt.

Es sollen damit nicht Stoffe ausgeschlossen werden, welche eine Reaktion beschleunigen und gleichzeitig ein Gleichgewicht ändern; eine Grenze zwischen solchen Stoffen und idealen Katalysatoren würde sich auch schwer ziehen lassen, sie würde davon abhängen, wie genau wir das Gleichgewicht festzustellen vermögen. Indessen zeigt die Literatur gerade der letzten Jahre, dass eine gewisse Umgrenzung des Begriffes Enzym wünschenswert ist; und so wird man diejenigen Stoffe prinzipiell nicht zu den Enzymen rechnen, welche gerade durch die Reaktion, an welcher sie mitwirken, nach stöchiometrischen Verhältnissen verbraucht werden.

Bei nicht enzymatischen Katalysen ist die Menge der reaktionsbeschleunigenden Substanz meist klein im Verhältnis zu derjenigen des umgesetzten Stoffes — ein idealer Katalysator sollte ja die Umsetzung unbegrenzter Mengen von „Substrat“ beschleunigen können. Einige Enzyme üben tatsächlich schon in den geringsten Quantitäten sehr grosse Wirkungen aus; meist ist aber ihre Tätigkeit zeitlich sehr begrenzt, und geht nicht über einen gewissen stofflichen Umsatz hinaus; es beruht dies, wie wir später sehen werden, teils auf der Beteiligung der Enzyme am Gleichgewicht einer Reaktion, teils auf der chemischen Unbeständigkeit dieser Stoffe. Als charakteristisch für Enzyme wird meist der Umstand angesehen, dass sie durch längeres oder kürzeres Erhitzen ihrer Lösungen auf höhere Temperatur, etwa 100°, unwirk-

sam werden. Bindend ist dieses Kriterium nicht, wie denn auch zwischen anorganischen Katalysatoren und Enzymen prinzipielle Unterschiede nicht bestehen. Sobald nämlich ein reaktionsbeschleunigender Bestandteil eines Organes chemisch aufgeklärt oder mit einem bekannten Stoff identifiziert ist, so liegt kein Grund mehr vor, diese Substanz als „Enzym“ zu bezeichnen; ob man für solche Stoffe den Namen „Enzym“ noch beibehalten will, oder ob man es vorzieht, auf den wissenschaftlich fester stehenden Begriff Katalysator zurückzugehen, ist lediglich Sache der Übereinkunft. Wie aber die Definition gewählt wird ist von untergeordneter Bedeutung; sind wir doch vom Ziel, der chemischen Aufklärung der Enzyme, in vielen Fällen noch so weit entfernt, dass der Begriff Enzym noch lange bestehen bleiben wird.

Die Grenze, welche die Enzyme von den Toxinen trennt, ist ebenfalls einigermassen willkürlich. Die Herkunft aus dem lebenden Organismus, die Fähigkeit Antikörper zu bilden und andere Eigenschaften, sowie auch wohl ihre Wirkungsweise, sind beiden Körperklassen gemeinsam. Andererseits sind die Toxine durch ihre Giftwirkung ziemlich scharf charakterisiert. Wir können von der Behandlung dieses umfangreichen Gebietes um so eher vollständig absehen, als gerade die physikalische Chemie der Toxine in den letzten Jahren eine eingehende Bearbeitung erfahren hat.

Ungleich wichtiger als die Beantwortung der Frage, wie die Enzyme abzugrenzen sind, ist die Aufgabe, die physikalischen und chemischen Eigenschaften der typischen Repräsentanten dieser merkwürdigen Stoffe festzustellen.

Als Ziel schwebt uns natürlich die exakte Beschreibung des Enzyms durch eine chemische Formel und durch die an der reinen Substanz gewonnenen charakteristischen Konstanten vor. Auch für die allgemeine Chemie der Enzyme ist es deshalb von der grössten Bedeutung, sich über den Reinheitsgrad und die Zusammensetzung der einzelnen Repräsentanten klar zu sein. In erster Linie sind hierzu präparative und analytische Arbeiten erforderlich, aber auch die physikalisch-chemischen Untersuchungen liefern andererseits hierfür wichtige Anhaltspunkte.

Es tritt uns zunächst die Frage entgegen, ob die Enzyme sich im Zustand der echten Lösung befinden, oder ob sie zu den Kolloiden gehören; exakter gesprochen, welche Enzyme sich dem einen und welche sich dem anderen Grenzfall nähern, und was überhaupt über ihre Molekulargrösse ausgesagt werden kann. Kriterien bilden hierbei die Adsorptionserscheinungen, die Diffusion, auch wohl das Verhalten im elektrischen Feld.

Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymwirkungen ist zwar nicht in dem Maasse charakteristisch, wie vielfach noch angenommen zu werden scheint, derselbe ist nämlich in hohem Grad von der Gegenwart zufälliger Verunreinigungen, Begleitsubstanzen u. dergl. abhängig. Immerhin ist die

Kenntnis dieses Einflusses von keineswegs geringer Bedeutung, besonders für die Wahl und Kritik der Arbeitsmethoden.

Unzweifelhafte, bedeutende Erfolge hat in den letzten Jahren das Studium der Aktivatoren bezw. der Ko-Enzyme gehabt; es soll hier nur an die Arbeiten von Harden und Young, sowie von Buchner und Meisenheimer erinnert werden, durch welche wesentliche, bei der alkoholischen Gärung beteiligte Faktoren aufgedeckt wurden. Auch in Bezug auf Hemmungskörper haben sich bemerkenswerte Regelmässigkeiten ergeben, unter welchen diejenigen, welche den Einfluss der Konfiguration betreffen, besonders zu erwähnen sind. Auch über die Einwirkung der Gifte sind wir jetzt soweit orientiert, dass wir für enzymatische Untersuchungen verschiedener Art gegen Bakterieninfektion wirksame, dem Ferment gegenüber aber unschädliche Stoffe angeben können, und dadurch vor den Täuschungen, welche ungenügende Desinfektion bei enzymologischen Arbeiten so oft veranlasst hat, sicherer sind.

Fällt auch die Mehrzahl der physiologisch so wichtigen Antikörper in das Gebiet der Toxine, so liegen doch so zahlreiche Beobachtungen über Antifermente vor, dass wir dieses Erscheinungsgebiet nicht unerwähnt lassen dürfen.

Haben wir uns im ersten Teil dieser Zusammenstellung über die chemischen Tatsachen der Enzymologie orientiert, so wenden wir uns im zweiten Teil der Frage zu: In welcher Weise wird eine Reaktion durch ein Enzym ausgelöst bezw. beschleunigt, und wie verlaufen die enzymatischen Reaktionen.

Wir werden uns in erster Linie die Gesetze der chemischen Dynamik vergegenwärtigen, welche für die enzymatischen Reaktionen in Betracht kommen, insbesondere aber die Resultate, welche sich aus dem Studium der Katalysatoren ergeben haben. Der Vergleich der nicht enzymatischen Katalysen mit den Fermentreaktionen wird uns dann zeigen, dass wir es in beiden Fällen mit denselben Vorgängen zu tun haben, und dass die Abweichungen, welche viele Enzymreaktionen von den bekannten Schulfällen der chemischen Dynamik aufweisen, sich ungezwungen durch die einfache Annahme deuten lassen, dass Enzym und Substrat zu mehr oder weniger festen Komplexen zusammentreten, welche als die „aktiven“ Moleküle zu betrachten sind, also die Reaktionen vermitteln.

An dieser Annahme halten wir um so mehr fest, als dieselbe unserer allgemeinen Auffassung von der Rolle der Katalysatoren entspricht, und wir aus ihr gleichzeitig eine andere Tatsache herleiten können, nämlich die mehrfach beobachteten Differenzen zwischen den stabilen Gleichgewichten und den enzymatischen Endzuständen.

Der Umstand, dass auch Enzym-Reaktionen nicht in einer Richtung vollständig verlaufen, sondern zu einem, allerdings von dem stabilen mehr oder weniger abweichenden, Gleichgewicht führen, zwingt uns zu dem Schluss,

dass Enzyme nicht nur hydrolytische Spaltungen zu beschleunigen vermögen, sondern auch die umgekehrten, synthetischen, Reaktionen katalysieren. In den 10 Jahren, welche seit der Synthese der Isomaltose durch Maltase (Croft Hill) verflossen sind, ist die Zahl der enzymatischen Synthesen bereits beträchtlich gewachsen; ihre Kenntnis ist natürlich für die Biochemie der Tiere und Pflanzen von grösster Bedeutung.

Für die allgemeine Chemie sind diese Vorgänge um so wichtiger, als die Enzyme bekanntlich gegenüber der sterischen Konfiguration der Substrate äusserst empfindlich sind und asymmetrische Produkte entstehen lassen. Die Enzyme setzen uns somit in den Stand, asymmetrische Synthesen auszuführen.

Kap. I.

Spezielle Chemie der Enzyme.

Nomenklatur.

Bei der bereits grossen und sich rasch vermehrenden Zahl der Enzymwirkungen ist eine rationelle Nomenklatur notwendig. Nach einem Vorschlag von Duclaux (vgl. Bourquelot, Les ferments solubles, Paris 1896) wird der Name des Enzyms von demjenigen Stoff abgeleitet, auf welchen er wirkt; so z. B. ist Laktase dasjenige Enzym, welches Laktose spaltet. Leider wird von diesem Prinzip noch vielfach abgegangen. Ist der aus dem Substrat abgeleitete Name nicht eindeutig, so ist nach dem Vorschlage E. O. von Lippmanns (Chem. Ber. **36**, 331; 1903; vgl. auch Buchner und Meisenheimer, Chem. Ber. **38**, 621), sowohl der Stoff, welcher zerlegt wird, als auch das (Haupt)-Produkt der Spaltung zur Namengebung heranzuziehen; z. B. wäre hiernach Amylo-Maltase das Enzym, welches Maltose aus Stärke bildet. Da nun aber dieses Enzym keine Maltase ist, sondern vielmehr zur Klasse der Amylasen gehört, so wäre es wohl zweckmässiger, einen solchen Stoff als Malto-Amylase zu bezeichnen. Allgemein angenommene Namen wie Pepsin, Zymase, Erepsin sind beibehalten worden. Wenn auch die Durchführung einer rationellen Namengebung wünschenswert ist, so muss doch einerseits den Entdeckern das Recht der Namengebung bezw. Namenänderung vorbehalten bleiben, andererseits ist der Wirkungsbereich und die Einheitlichkeit von Enzymen wie Pepsin noch nicht so vollständig sichergestellt, dass sich ohne weiteres ein vollständig treffender Name ergibt.

Systematik.

Die Grundlagen für die Systematik der Enzyme bilden, da über die Natur der Enzyme selbst sehr wenig bekannt ist, die chemischen Reaktionen, welche sie auslösen. Es ist zu erwarten, dass man einmal die Zusammen-

gehörigkeit, welche sich aus der chemischen Wirksamkeit ergibt, bei der Beschreibung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Enzyme wiederfinden wird.

Eine Aufzählung aller in der Literatur beschriebenen Enzyme liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit; übrigens ist die Zahl derjenigen Enzyme, deren Individualität nicht genügend sichergestellt ist, sehr gross.

Die folgende Zusammenstellung bezweckt vielmehr nur einen allgemeinen Überblick über diejenigen typischen Reaktionen zu geben, an deren Verlauf Enzyme beteiligt sind.

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Hydrolysen	**Ester**	Fettsäuren + Alkohole	Esterasen
	Fette	höhere Fettsäuren + Glycerin	Lipasen
	niedere Ester	niedere Fettsäuren + Alkohole	Butyrasen
	Höhere Kohlehydrate		
	Cellulose		Cellulase
	Hemicellulose		Cytase
	Stärke, Glykogen	Maltose, (Dextrine)	Amylasen u. Amylopektinasen
	Inulin	Fruktose	Inulinase
	Pektosen	Pektin	Pektase
	Glukoside inkl. Polysaccharide	Hexosen u. Glukosidreste	
	α-Glukoside und α-Galaktoside	Glukose, Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	Maltase
	β-Glukoside und β-Galaktoside	Glukose, Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	Emulsin
	β-Galaktoside	Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	Laktase
	Fruktoside	Fruktose + Zuckerrest	Invertase
	andere Glukoside	andere Zuckerarten + Phenole u. a.	Rhamnase, Myrosin u. a.
	Phytin	Inosit + Phosphorsäure	Phytase
	Digallussäure (Tannin)	Gallussäure	Tannase
	Carbaminderivate		
	$R.CO.NH.R^1$	$R.COOH + H_2N.R^1$	Carbamasen, Proteinasen
	Proteine	Albumosen, Peptone	Pepsin, Papain
	Proteine, Albumosen Peptone, Peptide	Peptide, Aminosäuren	Trypsin, Erepsin
	Arginin	Harnstoff + Ornithin	Arginase
	Nukleinsäure	Nukleinbasen + Phosphorsäure	Nuklease

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Hydrolysen	**Säureamide**		
	Harnstoff	Kohlensäure + NH_3	Urease
	Amine		(Desamidasen)
	Aminosäuren	Oxysäuren + NH_3	Desamidase
	Guanin	Xanthin + NH_3	Guanase
	Adenin	Hypoxanthin + NH_3	Adenase
Sauerstoff-übertragung	Peroxyde	Reduktionsprodukte der Peroxyde + O	Peroxydasen
Spaltung	Hydroperoxyd	molekularer Sauerstoff + Wasser	Katalasen
Unbekannte Vorgänge unter Koagulation	Kasein	Parakasein (+ Molkeneiweiss)	Chymosin
	Fibrinogen	unlösl. Fibrin	Fibrinferment (Thrombin)
	Pektine	Pektinate	Pektinase
Gärungen	Glukose	Milchsäure	Milchsäurebakterienzymase
	Milchsäure	Alkohol + Kohlensäure	Laktacidase
Oxydationen	Phenole	Chinone	Phenolasen
	Aldehyde	Säuren	Aldehydasen
	Alkohol	Essigsäure	Alkoholoxydase der Essigsäurebakterien

Einige Enzyme anderer Wirkungsart sind im Anhang zu Kap. I erwähnt.

Der Wirkungsbereich der Enzyme. Ihre Darstellung und Reinigung.

Was in diesem Abschnitt mitgeteilt werden soll, sind solche Daten, welche zum Verständnis des allgemeinen Verhaltens der Enzyme notwendig erscheinen.

Die Dynamik der Enzyme leidet ja in hohem Grade an dem Übelstand, dass wir über ihre Zusammensetzung nichts wissen, und deswegen über die chemischen Einzelvorgänge, welche bei ihrer Wirkung in Betracht kommen, von vornherein keinerlei Vorstellung haben. Um so mehr wird es notwendig, alle die Einflüsse experimentell aufzusuchen und kennen zu lernen, welche sich bei enzymatischen Reaktionen geltend machen können, wenn wir nicht Gefahr laufen wollen, den sicheren Boden für die theoretische Behandlung des Gebietes ganz zu verlieren.

Insbesonders möchte der Verf. betonen, dass der Darstellung und Reinigung der Enzyme, welche zu physikalisch-chemischen Messungen verwendet werden sollen, gar nicht genug Aufmerksamkeit gewidmet werden kann.

Enzymhaltige Präparate werden entweder durch Auspressen oder durch Extrahieren der Organe mit geeigneten Lösungsmitteln gewonnen. Die zufällige Beschaffenheit des Ausgangsmateriales, die konstanten Beimengungen, das Alter, überhaupt die „Vorgeschichte“ der Präparate beeinflusst nicht nur die Wirkungsintensität sondern auch die Wirkungsweise der Enzyme in höherem Grade, als in vielen Arbeiten vorausgesetzt wird. Die Kenntnis des Materiales ist somit zur kritischen Beurteilung der Versuchsresultate unerlässlich.

Vielfach üben Organextrakte oder Präparate mehrere enzymatische Wirkungen zugleich aus; so hydrolysiert, um ein Beispiel aus der neueren Literatur zu wählen, ein aus Crotonsamen erhaltenes Präparat nach Scurti und Parrozani (Gazz. chim. ital. **37**, 476; 1907) nicht nur Fette und Ester einbasischer Säuren, sondern auch Rohrzucker und Eiweisskörper. Man wird daraufhin aber nicht die Existenz eines Enzyms mit allgemein hydrolysierender Fähigkeit annehmen, sondern schliessen, dass das angewandte Präparat mehrere Enzyme enthielt.

Zum Studium der einzelnen Komponenten haben wir die verschiedenen Wirkungen zu trennen, und wenn es gelungen ist, ein Präparat herzustellen, welches nur eine einzige Reaktion auslöst, so bezeichnen wir dasselbe als biologisch rein. Immerhin bleibt dann noch die Möglichkeit, dass die einzelnen Stadien der Reaktion durch verschiedene Bestandteile des Enzyms beschleunigt werden. So ist es z. B. wahrscheinlich geworden, dass an der Hydrolyse des Amygdalins zwei Enzyme beteiligt sind, von denen eines die Spaltung in Glukose und Mandelsäurenitrilglukosid bewerkstelligt, während das andere den letzteren Körper angreift und ihn in Blausäure, Benzaldehyd und Glukose zerlegt.

Vom Zustand der chemischen Reinheit sind auch die biologisch reinsten Enzyme noch ausserordentlich weit entfernt, und wir besitzen, wie gleich betont werden soll, keinerlei Sicherheit, dass auch nur eine annähernde Isolierung irgend eines hydrolysierenden Enzyms bis jetzt gelungen ist. Dies beruht auf der Labilität der Enzyme, welche im Verlauf längerer und energischer Reinigungsprozesse unwirksam werden, wodurch ihre Gegenwart nicht mehr erkannt werden kann; ferner auf den äusserst geringen Konzentrationen, in welchen die Enzyme in der Natur stets vorzukommen scheinen, und endlich auf der grossen Menge von Verunreinigungen der Extrakte und zwar durch grossenteils kolloide Stoffe.

Von den Oxydasen, welche zum Teil wärmestabil sind, hat denn auch wenigstens ein Vertreter chemisch erkannt werden können.

Wir werden später sehen, dass die Verunreinigungen der Enzyme oft das Verhalten gegen äussere Einflüsse, gegen Temperatur, Säuren, Alkalien, Ko-Enzyme usw. bestimmen oder mitbestimmen.

In Rücksicht auf die Bedeutung der Reinigungsprozesse für die Enzymologie sind die darauf bezüglichen Methoden ziemlich ausführlich behandelt worden.

Wie andererseits nochmals ausdrücklich gesagt werden soll, liegt eine vollständige Literaturangabe über die einzelnen Enzyme ausserhalb des Rahmens dieser Schrift. Abgesehen wurde natürlich in erster Linie von den Arbeiten, denen ein bleibender Wert nicht zuerkannt werden kann, ferner aber von Untersuchungen, welche sich auf rein physiologische Fragen und auf die Verbreitung der Enzyme im Tier- und Pflanzenreich beziehen. Mit der allgemeinen Chemie der Enzyme stehen diese Arbeiten nicht in direktem Zusammenhang.

Esterasen.

Die allgemeine Wirksamkeit dieser Enzyme besteht in der Hydrolyse von Estern. Hierbei erweisen sich die Enzyme dieser Gruppe mehr oder weniger ausgesprochen spezifisch, worauf wir in Kap. VIII noch näher zurückkommen. Erwähnt muss werden, dass Magenlipase nicht nur eigentliche Fette, sondern auch die Lipoide Lecithin, Jecorin und Protagon spaltet (P. Mayer, Biochem. Z. **1**. — Schumoff-Simanowski und Sieber, H. **49**). Auch der Pankreassaft spaltet nach Abderhalden u. a. Lecithin (ein negatives Resultat erhielten jedoch Kalaboukoff und Terroine [Soc. Biol. **66**]). Eine besondere Klasse bilden die

Lipasen, welche speziell die natürlichen Fette spalten, also die Glycerinester der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure.

Tierische Lipasen spielen eine wichtige Rolle im Magen (Magensaft und Magenschleimhaut)[1]), Pankreas[2]) und Darm[3]) höherer Tiere. Auch im Serum finden sich Lipasen (Neuberg und Mitarbeiter), und nach Pagenstecher (Biochem. Z. **18**) enthalten sämtliche Organe des Rindes Lipasen, am meisten Leber und Milz. Diese tierischen Enzyme spalten sowohl tierische als pflanzliche Fette und Öle.

Auch im Hühnereiweiss ist eine Lipase aufgefunden worden. Im allgemeinen lassen sich aus tierischen lipasehaltigen Organen nur relativ schwer wirksame Extrakte gewinnen, und Connstein betont, dass man sich zur Fettspaltung am besten des Pankreassaftes oder der zerkleinerten Drüse selbst bedient. Aristides Kanitz gibt allerdings an, wirksame Glycerin-

[1]) F. Volhard, Z. klin. Med. **42**, 414 und **43**, 397; 1901. — W. Stade, Hofm. Beitr. **3**, 291; 1903. — A. Zinsser, Hofm. Beitr. **7**, 31; 1906. — A. Fromme, Hofm. Beitr. **7**, 51; 1906. — A. Falloise, Arch. internat. de phys. **3**, 396; 1906 und **4**, 405; 1907.

[2]) H. Engel, Hofm. Beitr. **7**, 77; 1905. — Umber und Brugsch, Arch. f. exp. Path. **55**, 164; 1906.

[3]) W. Boldyreff, H. **50**, 394; 1907.

extrakte erhalten zu haben (H. **46**, 482; 1905), und Lewkowitsch und Macleod berichten über Neutralfett spaltende wässrige Lipaselösungen (Proc. Roy. Soc. **72**). Die Darstellung von Lipasepräparaten aus Pankreas ist von Dietz und Pottevin näher ausgearbeitet worden (Bull. Soc. Chim. [3], **35**, 693; 1906. — Vergl. auch E. Baur, Z. f. angew. Chem. **22**, 97; 1909.).

Die Literaturangaben über Lipasen widersprechen sich ausserordentlich oft; indessen dürfte feststehen, dass Magenlipase und Pankreaslipase auch bezüglich ihrer Eigenschaften nicht identisch sind. Die beiden tierischen Lipasen scheinen in einem ähnlichen Verhältnis zueinander zu stehen wie die entsprechenden proteolytischen Enzyme Pepsin und Trypsin; jedenfalls unterscheiden sich beide wesentlich von den Samenlipasen.

Pflanzliche Lipasen werden aus ölhaltigen Samen, besonders aus denjenigen der Ricinusarten gewonnen. Die ersten Arbeiten über Ölsamenlipasen haben Green (Proc. Roy. Soc. **48**, 370; 1890) und Sigmund ausgeführt. Weitere Beiträge zur Kenntnis dieser Enzyme verdankt man Connstein, Hoyer und Wartenberg (Chem. Ber. **35**, 2988; 1902), ferner Nicloux (Soc. Biol. **56**, 840; 1904 und Proc. Roy. Soc. B. **77**, 454; 1906), H. E. Armstrong (Proc. Roy. Soc. B. **76**, 606; 1905) u. a. Eine sehr gute Monographie hat Connstein für die „Ergebnisse der Physiologie“ (**3**; 1904) geschrieben. Bei E. Rouge (Zentralbl. f. Bakt. II, **18**; 1907) findet man eine Literaturzusammenstellung speziell über pflanzliche Lipasen.

Ricinuslipase ist nur in saurer Lösung, und zwar von auffallend starkem Titer wirksam. In den Samen ist es die Milchsäure, welche die Lipase aktiviert (Hoyer, H. **50**, 414; 1906). Die Samen aus Abrus precatorius, welche den Ricinussamen nahestehen, spalten Fette nach Braun und Behrend (Chem. Ber. 1903) in neutraler Lösung; immerhin ist der Effekt verhältnismässig schwach. Charakteristisch ist für das Ricinusenzym, wie für die meisten eigentlichen Lipasen, deren Unlöslichkeit in Wasser; man ist deshalb gezwungen, die Presskuchen, welche bei der Entölung der Samen übrig bleiben, mit der Fettemulsion in innige Berührung zu bringen.

Von den übrigen Vorkommnissen pflanzlicher Lipasen seien die Pilze erwähnt, und zwar sowohl Hutpilze als die niedrigen Arten, wie Penicillium (Gérard, C. r. **124**, 370; 1897, Camus, Soc. Biol. **49**, 192; 1897), Aspergillus niger (Camus l. c.) und besonders Hefe (Delbrück). Auch in zahlreichen Bakterien sind Lipasen nachgewiesen; sie bewirken das Ranzigwerden der Butter und anderer natürlicher Fette; (Literatur bei Fuhrmann, Bakterienenzyme; Jena 1907).

Butyrasen. Gegen die ausgedehnte Anwendung der niederen Fettsäureäthylester und der Monoglyceride zum Studium der Lipasen ist mehrfach Einspruch erhoben worden. Insbesondere haben Arthus (Soc. Biol. **53**, 381; 1902), sowie Doyen und Morel (C. r. **134**, 1001 und 1254; 1902)

nachgewiesen, dass Hanriots Versuche mit Monobutyrin (Soc. Biol. **48**, 925. — C. r. **123**, 753; 1896), welche übrigens in vieler Hinsicht die Kritik herausfordern, nichts über die Anwesenheit und Wirkung der eigentlichen Lipasen aussagen. Zwischen Lipasen und Esterasen (Butyrasen) ist also zu unterscheiden. Letztere Enzyme, welche reichlich in vielen Säften und Organen vorhanden sind (Blutserum, Leber, Niere), spalten nicht nur die Ester der niederen aliphatischen Fettsäuren mit einwertigen Alkoholen und mit Glycerin, sondern auch Salicylsäureamylester (H. Chanoz und H. Doyon, Soc. Biol. **52**, 116 und 717; 1900) und ähnliche Verbindungen. Identisch mit diesen Enzymen sind vielleicht die Histozyme Schmiedebergs. Sehr eingehend sind Leber- und Pankreasesterasen von Kastle, Loevenhart und Elvove untersucht worden (vgl. Kap. III).

Dakin hat durch Leberesterasen asymmetrische Esterspaltungen erzielt, worauf wir im Kap. 8 näher zurückkommen. Sehr eingehende Studien über das gleiche Enzym verdankt man Kastle, Loevenhart und Elvove, deren quantitative Messungen im dritten Kapitel referiert werden. Sie geben folgende Vorschrift zur

Darstellung von Leberesterasen. Die mazerierte Leber wird mit Wasser extrahiert (100 ccm auf 10 g Leber) und der Extrakt wird durch ein leinenes Tuch filtriert. Von diesem Extrakt werden 20 ccm mit 72 ccm Wasser verdünnt und mit 8 ccm einer 0,01 norm. Salzsäure versetzt. Erwärmt man diese Mischung auf 40°, so fällt ein schwerer Eiweissniederschlag aus. Filtriert man ab, so erhält man eine klare, goldgelbe Lösung.

An der Wirkung der Pankreas-Lipase ist ein kochbeständiges Ko-Enzym beteiligt (R. Magnus, H. **42**, 149; 1904), dessen wesentliche Bestandteile gallensaure Alkalisalze sind (Magnus, H. **48**; siehe ferner Kap. V).

Die Enzyme der höheren Kohlehydrate.

Cytasen. Ob eigentliche Cellulose fermentativ gespalten wird, ist noch zweifelhaft. Besser bekannt ist, besonders durch die Untersuchungen von Mc Grillowry, H. T. Brown und Morris (Journ. Chem. Soc. **57**; 1890), von Green Ann. of Bot. **7**; 1893) und eine neuere Arbeit von Schellenberg (Flora **98**) die Cytase, deren Substrat die Hemicellulosen und deren Reaktionsprodukte Mannose und Galaktose sind; auch Pentosenpolysaccharide, Pentosane, werden gespalten; ob aber die Hydrolyse vollständig ist, bleibt noch ungewiss. Solche Enzyme finden sich im Darm der Pflanzenfresser, in Holzpilzen (Czapek, Lotos **98**; Schorstein, Zbl. f. Bakt. **9**) und in Bakterien. Auch Hydrocellulosen, welche, soweit bekannt, mit den Hemicellulosen sehr nahe verwandt sind, werden durch Cytasen zerlegt. Zu der gleichen Enzymgruppe gehören ferner die Carobinase, welche das Carobin im Johannisbrot auflöst (Effront, C. r. **125**, 116; 1897), und die von Bourquelot und

Hérissey (C. r. **129** u. **130**; 1899 u. 1900) als Seminasen bezeichneten Enzyme in Luzernen, Trigonella und anderen Gewächsen. Ausser in Pflanzen findet man Cellulasen, bezw. Cytasen im Tierkörper, und zwar im Darm von körnerfressenden Tieren (Brown, Journ. Chem. Soc. **61**; 1892), in Schnecken (Biedermann u. Moritz, Pflüg. Arch. **73**; 1898) und in Fischen (Knauthe).

Amylasen. Unter Amylasen — oder genauer Malto-Amylasen — fasst man diejenigen Enzyme zusammen, welche Stärke und Glykogen abbauen, und zwar zu Maltose. Über die Einheitlichkeit der Amylasen lässt sich noch sehr wenig Bestimmtes aussagen.

Nachdem in den Arbeiten von Brown und Morris und von Green die Ansicht ausgesprochen worden ist, dass wenigstens zwei Enzyme von ungleichem biologischem Verhalten zu unterscheiden sind (Translokations- und Sekretionsdiastase), hat Maquenne (Bull. Soc. Chim. de Paris 1906) in bemerkenswerten Untersuchungen die chemische Seite der Stärkeverzuckerung aufgeklärt. Stärke besteht hiernach aus 80—85% Amylose und 15—20% Amylopektin. Amylase greift gelöste Amylose und somit „lösliche Stärke“ sehr leicht an, Amylopektin (Stärkekleister) nur sehr langsam an. Amylopektinase hingegen verzuckert energisch das Amylopektin (Kleister). Die in den verschiedensten Organen des Tier- und Pflanzenreiches nachgewiesenen Diastasen dürften alle die beiden diastatischen Enzyme enthalten. Dass oft die verzuckernde und die lösende Wirkung der „Diastasen“ parallel gehen, zeigt u. a. eine Untersuchung von Chrzaszcz (Zeitschr. f. Spiritusindustr. 1908). Eine neuere, bemerkenswerte Untersuchung über pflanzliche diastatische Enzyme verdankt man Butkewitsch (Biochem. Z. **10**). Weitere diesbezügliche Untersuchungen wären wünschenswert, ebenso ein eingehenderes Studium über die diastatische Spaltung des Glykogens.

Auch die Einheitlichkeit der eigentlichen, vom Amylopektin gesonderten Amylasen wird zweifelhaft, wenn man die weitgehende Spaltung bedenkt, welche erforderlich ist, um von der hochkondensierten Stärke über die Dextrine bis zur Maltose zu kommen. Nachdem Fräulein Tebb (Journ. of Physiol. **15**), Brown und Morris, Röhmann (Chem. Ber. **27**), Hamburger (Pflüg. Arch. **60**) und Beijerinck (Zbl. f. Bakt. (II) **1**), in dem Stärke verzuckernden Enzymgemisch ein Enzym nachgewiesen hatten, welches die Spaltung Stärke-Maltose bewirkt, und ein anderes, welches die Maltose weiter zu Glukose abbaut, nehmen Wijsman (Rec. Trav. Chim. **9**; 1890), Pottevin u. a. für die Reaktion Stärke-Dextrin und Dextrin-Maltose je ein besonderes Enzym[1]) an, und neuerdings sprechen auch Ascoli und Bonfanti (l. c.) von mehreren Amylasen.

---

[1]) Die Behauptung Lintners, dass bei der Spaltung der Stärke Isomaltose entstehe, kann nunmehr durch die mehrfachen Nachprüfungen besonders von Ling und Baker sowie von Brown und Morris (Journ. Chem. Soc. **67**) als widerlegt gelten.

Vorkommen. Glykogen und Stärke spaltende Enzyme sind im Tierreich, wie schon Claude Bernard gefunden hatte, sehr verbreitet. Das von diesem Forscher nachgewiesene Vorkommen im Blutserum wurde durch Bial, Pick, Ascoli und Bonfanti (H. 43; 1904) näher studiert. Nach Nasse kommt ein solches Enzym im Muskelsaft vor, wodurch eine Untersuchung Halliburtons (Journ. Physiol. 8; 1887) bestätigt wird. Carlson und Luckhardt (Amer. Journ. of Physiol. 23) haben Amylase noch in zahlreichen anderen Körperflüssigkeiten gefunden. Lange bekannt ist ferner die Stärke lösende Fähigkeit des Speichels, welche bereits 1831 von Leuchs einem Enzym, Ptyalin, zugeschrieben wurde. Auch Foster und von Wittich fanden amylolytische Enzyme in sehr vielen Organen; besonders reich an glykogenspaltendem Enzym erwiesen sich ausser der Leber und dem Pankreas auch die Muskeln und zwar wie Mendel und Saiki (Amer. Journ. of Physiol. 21; 1908) bei einer Untersuchung am Schwein fanden, bereits vom Embryonalzustand an, während sonstige Organe verschiedener Tiere gewöhnlich mit zunehmender Entwickelung reicher an Enzym werden (Pugliese u. a.). Eine Amylase findet sich nach Roger (Soc. Biol. 64) auch im Hühnerei (Weiss und Gall) und soll teilweise in Äther löslich sein.

Nicht minder biologisch wichtig als die tierischen Amylasen sind die pflanzlichen. Entdeckt wurde die stärkespaltende Wirkung gekeimter Gerste durch Kirchhoff bereits 1814. Ein Enzympräparat wurde 1833 von Payen und Persoz dargestellt und erhielt den Namen „Diastase“, der auch heute noch vielfach gebraucht wird, aber im Interesse einer möglichst rationellen Nomenklatur durch die exakteren Namen Amylase, Amylopektinase usw. zu ersetzen ist[1]). Als Diastase mag einstweilen die Gesamtheit der verzuckernden Enzympräparate, also die Mischung von Amylasen, Dextrinasen etc. bezeichnet werden[2]).

Entsprechend der Aufgabe der Diastasen, den Stoffwechsel der Polysaccharide allgemein zu regeln sind diese Enzyme in allen Pflanzenteilen sehr verbreitet und finden sich reichlich n Schösslingen und Blättern, besonders bei Leguminosen und Gräsern (Brown und Morris, Journ. Chem. Soc. 63; 1893). Amylasen sind ferner in Kartoffeln und Zuckerrüben nachgewiesen, sowie in keimenden, stärkehaltigen Pollenkörnern (Green), in der Rinde mancher Pflanzen (Butkewitsch, Biochem. Z. 10), in Milchsäften, in vielen höheren und niedrigeren Pilzen, besonders in mehreren Hefenarten — hier dürfte die Diastase mit dem Glykogengehalt in Zusammenhang stehen — und schliesslich in Bakterien.

Besonders zu erwähnen ist die sogenannte Takadiastase, das Gemisch verzuckernder Enzyme aus Aspergillus Oryzae, einem Pilz, welcher in der Kojihefe enthalten ist. Sie verzuckert Stärke, und zwar nach den Angaben von Stone und Wright und von Takamine energischer als Malzdiastase. Versuche zu ihrer Reindarstellung hat Wroblewski (Chem. Ber. 31) ausgeführt.

Darstellung. Unter den tierischen Amylasen eignet sich wohl diejenige des Speichels, das Ptyalin, am besten zur Darstellung. Nach J. Cohnheim (Virch. Arch. 28; 1865) wird der Speichel mit frisch erzeugtem Calcium-

[1]) Die Nomenklatur Wijsmans ist keinesfalls annehmbar. Sind wirklich zwei Enzyme an der Maltosebildung beteiligt, so sind sie als Amylase und Dextrinase zu unterscheiden.

[2]) Sehr erwünscht wäre es auch, wenn die Bezeichnung „diastases“ als Gattungsname für Enzyme aus der französischen Literatur verschwände. Für diesen Namen gibt es zwar eine historische Erklärung; eine Berechtigung hat er hingegen nicht, und gibt nicht selten zu Missverständnissen Anlass.

phosphat gefällt. Aus dem Niederschlag löst man das Ptyalin mit Wasser, und fällt nun die Lösung mit Alkohol. Eine andere Methode gibt Krawkow an (Chem. Ber., Ref. 1887), welcher die Speicheldiastase durch Ammoniumsulfat fällt.

Auch direkte Fällung des Speichels mit Alkohol liefert ein verzuckerndes Präparat.

Die Pankreasdiastase nimmt v. Wittich in wasserfreiem Glycerin auf.

Grössere und reinere Ausbeuten an Amylase gewinnt man aus pflanzlichem Material. Aus Malz hat Lintner Diastase in folgender Weise dargestellt: Ein Teil Grünmalz (oder lufttrockenes Malz) wurde 24 Stunden mit 2—4 Teilen 20%igem Alkohol extrahiert. Der Extrakt wurde mit 2,5 Teilen seines Volumens absolutem Alkohol gefällt, und der Niederschlag mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Loew (Pflüg. Arch. **27** und **36**) weicht gekeimte Gerste in etwas Wasser auf, und extrahiert dann mit 4%igem Alkohol. Er fällt den Extrakt mit Bleiessig, suspendiert den Niederschlag in Wasser, entbleit die Lösung mit Schwefelwasserstoff, und fällt schliesslich die Diastase mit Alkohol-Äther.

Osborne und Campbell (Journ. Amer. Chem. Soc. **18**) salzen die Diastase mit Ammoniumsulfat aus, ebenso Wroblewski (H. **24**; 1897).

Effront (Die Diastasen; Leipzig 1900; S. 113 u. ff.) schlägt vor, das Malz mit Wasser zu extrahieren, und um die Menge derjenigen Extraktstoffe, welche kein diastatisches Vermögen besitzen, zu vermindern, ruft er in diesem Infus eine Alkoholgärung durch Hefen hervor, welche zuvor sehr stickstoffarm gemacht wurden. Die Alkoholgärung, sagt Effront, zerstört eine grosse Menge der Kohlehydrate, entfernt beträchtliche Mengen von Eiweisskörpern und Salzen, und lässt hierbei die Diastase vollkommen unberührt.

Wroblewski (H. **24**; 1897) gibt folgende Vorschrift:

Feingemahlenes Malz wird zuerst mit 70%igem, dann zweimal mit 45%igem Alkohol ausgezogen. Die beiden letzten Auszüge werden mit soviel starkem Alkohol versetzt, dass in der Flüssigkeit 70%iger Alkohol enthalten war. Der entstandene Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol und Äther ausgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Zur weiteren Reinigung salzte Wroblewski (Chem. Ber. **31**, 1130; 1898), wie auch Osborne und Campbell taten (Journ. Amer. Chem. Soc. **18**), mit Ammoniumsulfat aus.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass Wroblewski die Diastase mit Sicherheit als einen Proteinstoff, welcher den Albumosen nahe steht, erkannt zu haben glaubte, während Diastase nach Th. B. Osborne (Chem. Ber. **31**, 254; 1898) eine albuminähnliche Substanz oder „die Verbindung eines Albumins mit einer Proteose“ ist. Er gibt für sein wirksamstes Präparat folgende Zusammensetzung an (berechnet für aschefreie Substanz): C 52,5%; H 6,72%; N 16,10%; S 1,90%. Die Lösung gab die charakteristischen

Eiweissreaktionen. Wroblewskis reinstes Präparat hatte einen Stickstoffgehalt von 16,5%; seine Lösung gab die Millonsche Reaktion leicht und deutlich, die Xanthoproteinreaktion leicht, die Biuretreaktion mit Rosafärbung; Quecksilberchlorid erzeugt nur eine Trübung, keinen Niederschlag.

Falls sich indessen die neueren Versuche von S. Fränkel und Hamburg (Hofm. Beitr. 8) bestätigen, enthält Diastase weder Eiweissgruppen noch reduzierende Kohlehydrate. Die nicht enzymatischen Substanzen wurden mit Bleiacetat gefällt, die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert, und weiter durch Gärung mit stickstoffhungrig gemachter Hefe und darauffolgende Filtration durch Pukallfilter gereinigt. Die sirupöse Flüssigkeit liefert nach dem Eintrocknen im Vakuum ein Pulver, das frei von gärbaren und reduzierenden Kohlehydraten und von Eiweiss ist. Es stellt eine sehr aktive Substanz dar, welche keine Biuret-, aber spurenweise Millonsche Reaktion gibt und Fehlingsche Lösung nicht reduziert. Molisch' Reaktion und Pentosenreaktion schwach. Bei der Dialyse gegen Brunnenwasser konnten die gelösten Diastasen in zwei Hauptgruppen zerlegt werden: die verzuckernden Diastasen diffundieren durch die Membran, die verflüssigenden bleiben zurück.

Auch Cohnheim hatte die Speicheldiastase eiweissfrei gefunden, wobei freilich nicht gesagt wurde, welche absoluten Mengen des Präparates zur Prüfung gelangt sind.

Inulinase. Neben Hemicellulosen, Stärke und Glykogen existiert als Reservestoff noch ein anderes Kohlehydrat, das Inulin. Das gleichzeitig mit diesem auftretende Enzym, die Inulase oder Inulinase zerlegt Inulin in seinen einfachsten Bestandteil, Fruktose. Stärke wird von Inulinase nicht angegriffen.

Green (Ann. of Bot. **1**; 1887) entdeckte das Enzym, das in zahlreichen Kompositen vorkommt, in den Knollen von Helianthus tuberosus (Artischoke). Bourquelot (Bull. Soc. Mycol. **9**; 1893 und **10**; 1894) wies Inulinase in Aspergillus niger nach und isolierte es aus dem Mycel dieses Pilzes. Überhaupt scheint das Enzym in Eumyceten verbreitet zu sein; wenigstens fand Dean (Bot. Gaz. **35**; 1903) dasselbe auch in Penicillium glaucum.

Das beste Medium ist 0,001%ige Salzsäurelösung.

Die Enzyme, welche Trisaccharide spalten, wie Melicitase u. a., sind bisher ungenügend individualisiert.

Die Enzyme der Polysaccharide.

Maltase. Als Maltasen wollen wir diejenigen Enzyme bezeichnen, welche spezifisch α-Glukoside spalten. Sie sind dadurch also einerseits gegen Emulsin abgegrenzt, das nur auf β-Glukoside wirkt, andererseits gegen Laktase und Invertase, welche die Spaltung der β-Galaktoside bezw. der Fruktoside beschleunigen.

Isomaltose, welches vielleicht als Glukose-β-Glukosid anzusehen ist (E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. **76**; 1905), wird durch Maltase nicht gespalten. Aus Amygdalin spalten Hefeenzyme ein Molekül Glukose ab, lassen aber das übrig bleibende Mandelsäurenitrilglukosid unangegriffen. Man schreibt diesen Effekt einem besonderen Enzym, der Amygdalase zu (vergl. S. 17 und 18).

Vorkommen. Sowohl im Tier- als im Pflanzenreich begleitet Maltase fast regelmässig die Diastasen, von denen sie oft nicht getrennt werden konnte. So fand man dieses Enzym im Blut und im Serum (Gley und Bourquelot, Soc. Biol. **47**. — Hamburger, Pflüg. Arch. **60**. — Tebb, Journ. of Physiol. **15**. — Fischer und Niebel, Berl. Sitz.-Ber. 1896). Ferner in zahlreichen Geweben (Shore und Tebb, Journ. of Physiol. **13**) besonders in der Leber, im Darm und Pankreas. Wie Frl. Tebb fand, lässt sich die Maltase aus diesen Organen, und zwar sowohl den frischen wie den getrockneten, mit Chloroformwasser ausziehen; dadurch ist die gegenteilige Angabe von Brown und Heron (Proc. Roy. Soc. **30**) widerlegt.

Besonders reichlich finden sich die Maltasen im Pflanzenreich. Vor allem ist hier das Vorkommen im Malz und in Hefepilzen zu erwähnen. Diese beiden Maltasen scheinen übrigens nicht vollkommen identisch zu sein (Fischer, H. **26**, 74; 1894). Die Milchzuckerhefen sowie die Kefirkörner enthalten statt Maltasen stets Laktasen. Saccharomyces Marxianus enthielt keine Maltase sondern nur Invertase (E. Chr. Hansen; E. Fischer und P. Lindner, Chem. Ber. **28**, 984; 1895). Von diesem Fall abgesehen kann gesagt werden, dass sich in Hefenauszügen neben Maltasen stets Invertase findet; nur in Saccharomyces octosporus fehlt nach Beijerinck sowie E. Fischer und P. Lindner (Chem. Ber. **28**, 984; 1895) die Invertase. In Saccharomyces apiculatus findet man weder Maltase noch Invertase.

Darstellung. Als Ausgangsmaterial für die Darstellung der Hefeenzyme Maltase und Invertase verwendet man am besten Reinkulturen. Die möglichst frische, scharf abgepresste Hefe muss nach E. Fischer (H. **26**, 74; 1898) zunächst 2—3mal mit der zehnfachen Menge Wasser verrieben und durchgeschüttelt werden. Die Entfernung der Mutterlauge geschieht am besten durch Filtration mit dem Pukallschen Ballonfilter. Die möglichst scharf abgesogene Hefe wird dann auf porösen Tontellern in dünner Schicht ausgebreitet und bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. Sie schrumpft dabei zusammen und nimmt eine dunkelgraue Farbe an. Nach 1—2 Tagen wird sie durch Zerreiben möglichst zerkleinert und abermals an der Luft getrocknet, bis sie ein lockeres Pulver bildet. Die letzte Trocknung kann auch bei einer Temperatur von 30—35° ausgeführt werden. In diesem Zustand lässt sich die Hefe monatelang aufbewahren, ohne dass die Maltase zerstört wird. Soll das Enzym dann zur Anwendung kommen, so wird die getrocknete Hefe mit der 10—15fachen Menge destillierten Wassers übergossen, bei 30—35° unter zeitweisem Umschütteln 12—20 Stunden ausgelaugt, und die Flüssigkeit durch Papier filtriert. Als Antiseptikum empfiehlt sich Toluol.

Röhmann (Chem. Ber. **27**, 3251; 1894) erhitzte seine Hefe vor der Extraktion während 1 Stunde auf 105—110°, ein Verfahren, welches sich nach Croft Hill nicht empfiehlt. Letzterer Forscher gibt folgende Vorschrift (Journ. Chem. Soc. **73**. 636; 1898): Gute, gepresste Unterhefe wird mit destilliertem Wasser durch dreimaliges Dekantieren gewaschen, auf einem bedeckten Filter gesammelt, dann auf poröser Unterlage ausgebreitet und im

Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Nach etwa 2 Tagen ist die Hefe trocken, und sie wird dann gepulvert und durch ein Tuch gesiebt, wodurch man sie als gelblich weisses Pulver erhält. Das Erhitzen geschieht in der Weise, dass man die Hefe auf einer doppelten Schicht feinen Tülls über der Öffnung eines Glasgefässes ausbreitet, welches sich in einem vorher auf 40° erhitzten Trockenschrank befindet. Man lässt dann die Temperatur von Viertelstunde zu Viertelstunde auf 60°, 70°, 90°, 100° steigen, und erhält diese Temperatur während einer Viertelstunde. Hierauf lässt man das Präparat im Exsikkator erkalten. Die Hefe wird gewogen, in einem Mörser mit dem 10fachen Gewicht einer 0,1%igen Natronlauge verrieben, in Flaschen gefüllt und unter Zugabe von Toluol bei Zimmertemperatur 3 Tage stehen gelassen. Hierauf wird der Extrakt filtriert, zuerst durch Papier, dann durch Chamberlandfilter. Setzt man 1 ccm dieses frischen Extraktes zu 20 ccm einer 2%igen Maltoselösung bei 30°, so werden in 40 Minuten etwa 20% hydrolysiert.

Trehalase. Die Trehalose, ein aus zwei Molekülen Glukose bestehendes Disaccharid, wird durch ein Enzym gespalten, welches Bourquelot in Aspergillus und anderen Pilzen, Fischer (H. **26**) in Grünmalzdiastase und in Hefen vom Frohbergtypus, Kalanthar (H. **26**) in mehreren anderen Hefen gefunden hat. Ob das Enzym, dessen Wirkungsoptimum bei sehr schwacher H-Konzentration liegt, von Maltase wesentlich verschieden ist, steht nicht fest; Bourquelot (vergl. Soc. Biol. **47**, 515; 1895) hält sie im Gegensatz zu Fischer für ein besonderes Enzym.

Emulsin. Dieses Enzym steht der Maltase insofern am nächsten, als es den Antipoden des durch Maltase spaltbaren α-Methyl-d-glykosids, das β-Methyl-d-glukosid hydrolysiert. Allgemein nimmt man mit E. Fischer nunmehr an, dass die durch Hefeenzyme (Maltase) spaltbaren Glukoside der α-Reihe angehören, während man diejenigen, welche durch Emulsin angegriffen werden, den β-Glukosiden zuzählt; hierbei fallen die Biosen in den allgemeinen Begriff der Glukoside.

Es soll nicht versäumt werden darauf hinzuweisen, dass E. Fischer, von welchem diese allgemeine Betrachtungsweise stammt, davor warnt, sie als ganz sicher anzusehen (Lieb. Ann. **365**, 1; 1909). „Denn Voraussetzung ist dabei, dass dasselbe Enzym sowohl die Alkoholglukoside wie die Glukosidoglukosen hydrolysiert. Solange man aber keine reinen Enzyme hat, und mit so komplizierten Gemengen wie Emulsin oder Hefeauszug arbeiten muss, besteht dafür keine Gewähr."

Von speziellen Glukobiosen, welche von Emulsin gespalten werden, sind zu nennen:

Isomaltose (Fischer, Chem. Ber. **28**, 3024; 1895; vergl. auch E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. **76**, B. 592; 1905), Gentiobiose (Bourquelot und

Hérissey, C. r. **135**, 399; 1902) und Cellobiose (E. Fischer und G. Zemplén, Lieb. Ann. **365**, 1; 1909).

Auch β-Methylgalaktoside werden von den Enzymen der Mandeln gespalten (E. Fischer, Chem. Ber. **28**, 1429; 1895); da nach Fischers Befund diese Enzyme gleichfalls die Spaltung von Laktose bewirken, so ist diese als β-Galaktosid zu betrachten; man wird aber nicht fehlgehen, wenn man mit Bourquelot und Hérissey (C. r. **137**, 56; 1903) und mit E. Fischer annimmt, dass diese Wirkung nicht von demselben Enzym ausgeht, welches β-Glukoside spaltet, sondern auf der Gegenwart eines Enzyms beruht, welches β-Galaktoside zerlegt, also entweder derselben Laktase, welche sich in Milchzuckerhefen findet, oder wenigstens einer damit nahe verwandten. Die Auffassung, dass Kephir-Laktase und Emulsin-Laktase verschieden sind, vertreten H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (Proc. Roy. Soc. **80**, 321; 1908). Sie nehmen an, dass das eine Enzym eine Galakto-Laktase, das andere eine Gluko-Laktase ist, und stellen sich vor, dass ersteres sich an den Galaktoserest, letzteres an den Glukoserest des Milchzuckers anlagert.

Amygdalin wird von Mandelenzymen bekanntlich in Glukose, Blausäure und Benzaldehyd gespalten; auch das Mandelsäurenitrilglukosid, welches durch Einwirkung von Hefeenzym auf Amygdalin entsteht, wird durch Emulsin in seine einfachsten Bestandteilen hydrolysiert (E. Fischer, Chem. Ber. **28**).

Ein biologisch reineres Präparat gewinnt man nach dem Befund von Pottevin (Ann. Inst. Pasteur **17**, 31; 1903) aus Aspergillus niger; das Aspergillus-Emulsin spaltet nämlich nur β-Glukoside, keine β-Galaktoside und keinen Milchzucker.

Man wird also am besten mit „Emulsin“ die Mischung der Glukoside spaltenden Enzyme bezeichnen, und die Präparate durch Angabe der Herkunft näher charakterisieren, so dass zwischen Aspergillus-Emulsin, Mandel-Emulsin etc. zu unterscheiden ist.

Für die Bestandteile wird man dann rationelle Namen wählen, so dass man den Ergebnissen von H. E. und E. F. Armstrong und Horton sowie Caldwell und Courtauld zufolge drei Bestandteile in Mandel-Emulsin unterscheiden wird, nämlich:

1. Ein Enzym, welches β-Glukoside spaltet, β-Glukosidase,
2. Ein Enzym, welches Milchzucker spaltet, eine Laktase (von Armstrong Gluko-Laktase genannt),
3. Amygdalase.

Die meisten natürlichen Glukoside sind β-d-Glukoside; dieselben werden, soweit bekannt, von Mandelemulsin alle gespalten. Zu den β-Glukosiden

scheinen auch die gepaarten Glukuronsäuren zu gehören; sie werden nach Neuberg (Erg. d. Physiol. **3**, 446; 1904) von Emulsin gleichfalls zerlegt.

Die synthetische Wirkung des Emulsins wird im Kap. 7 näher behandelt.

Vorkommen. 1. Phanerogamen. Ausser in den Mandeln fand man Emulsin noch in den Blättern von Prunus Laurocerasus (wo auch das Laurocerasin vorkommt) in den Samen vieler Rosaceen, in Manihot (Guignard) und in Extrakten zahlreicher Pflanzen, wie Monotropa, Polygala (Bourquelot, Journ. de et Pharm. Chim. (5) **30**, 433; 1904), Malus communis, Hedera helix etc. (Hérissey, Recherches sur l'Emulsine. Thèse. Paris 1899. l. c.).

2. Kryptogamen. Gleichzeitig aufgefunden in Penicillium glaucum von Gérard (Soc. Biol. **45**) und in Aspergillus niger von Bourquelot, welcher glukosidspaltende Enzyme auch in vielen anderen Pilzen, besonders in den Holz bewohnenden Polyporus-Arten nachwies. Hérissey hat Emulsin in vielen Flechten und Moosen gefunden. Eine Spaltung nicht näher bekannter Glukoside durch Emulsin hat neuerdings Bourquelot (Arch. d. Pharm. **245**) in sehr vielen Arten konstatiert. Emulsin in Bakterien nachzuweisen gelang Fermi und Montisano (Zentralbl. f. Bakt. I, **15**; 1894), Gérard (Soc. Biol. 48) und Twort (Proc. Roy. Soc. **79**), welcher 44 Bakterienarten prüfte und mit 27 Glukosidspaltung erzielte.

Tierische, dem Emulsin nahestehende Enzyme in Nieren von Pferd und Kaninchen fand Gérard (Soc. Biol. 48 und **53**). In Mollusken fanden Bierry und Giaja (Soc. Biol. **58**) Populin und Phloridzin spaltende Enzyme; amygdalinspaltend wirken Auszüge von Kreuzspinnen (Kobert und W. Fischer).

Glukosidspaltungen durch tierische Extrakte hat ferner Gonnermann beobachtet (Pflüg. Arch. **103** und **113**) und neuerdings Kobert. Nach diesem Forscher hydrolysiert der Extrakt aus Placenta Amygdalin, Arbutin, Salicin und Helicin.

Darstellung: Hérissey (Thèse; vergl. Bourquelot, Arch. d. Pharm. **245**, 173; 1907).

100 g süsse Mandeln werden ungefähr eine Minute lang in kochendes Wasser getaucht und nach dem Abtropfen sorgfältig geschält. Hierauf zerstösst man dieselben in einem Mörser, ohne Zusatz von Wasser so fein wie möglich, und mazeriert das erhaltene Produkt mit 200 ccm eines Gemisches aus gleichen Teilen destilliertem Wasser und mit Chloroform gesättigtem Wasser. Nach ungefähr 24stündiger Mazeration bei gewöhnlicher Temperatur koliert man unter Auspressen durch ein angefeuchtetes Tuch. Man sammelt auf diese Weise 150—160 ccm Flüssigkeit, welcher man 10 Tropfen Eisessig zufügt, um das Kasein zu fällen. Das auf diese Weise klare Filtrat (120—130 ccm) fügt man zu 500 ccm Alkohol von 95%, sammelt den Niederschlag auf einem glatten Filter, und behandelt ihn nach dem Abtropfen mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Alkohol und Äther. Nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure erhält man hornartige, durchscheinende Plättchen, welche beim Zerreiben ein fast weisses Pulver liefern.

Amygdalase nennen, wie erwähnt, Caldwell und Courtauld (Proc. Roy. Soc. **79**, 350) den Bestandteil des Mandelemulsins, welcher die Spaltung des Amygdalins in Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose bewirken soll.

Andere glukosidspaltende Enzyme.

Die Mannigfaltigkeit der Individuen in dieser Gruppe scheint sehr gross zu sein. Wirkungsbereich und Spezifität der beschriebenen Enzyme sind meist noch in hohem Grade unsicher. Der β-Glukosidase am nächsten steht wohl die

Gaultherase oder Betulase, deren spezifische Wirkung in der Spaltung des Glukosides des Salicylsäuremethylesters (des Gaultherins) besteht. Weder Salicin noch Amygdalin wird durch dieses Enzym angegriffen.

Vorkommen. Ausschliesslich in Pflanzen: In der Rinde von Betula lenta wurde das Enzym von Schneegans entdeckt (siehe Arch. d. Pharm. **232**; 1894). Gleichzeitig fand es Bourquelot in mehreren Polygala-Arten, Azalea-Arten, in Spiraea ulmaria, in Monotropa hypopitys und Gaultheria procumbens (C. r. **123**, 315; 1896 und Journ. de Pharm. et Chim. **3**, 577; 1896).

Darstellung nach Bourquelot (l. c.): Monotropa-Pflanzen werden mit Sand zerrieben; durch halbstündige Digestion mit 95%igem Alkohol wird das Glukosid entfernt; das Enzym befindet sich im Rückstand, der mit Alkohol und Äther rasch getrocknet wird; es kann aus demselben durch Wasser ausgezogen werden. Vergl. auch Beijerinck (Zbl. f. Bakt. II **5**, 425; 1899).

Ein nicht näher untersuchtes Enzym, welches Populin und Phillyrin, ein in der Rinde von Phillyrea latifolia vorkommendes Glukosid spaltet, erwähnt Schützenberger.

Ein salicinspaltendes Enzym, das nicht mit Emulsin identisch sein soll, hat Sigmund (Monatsh. f. Chemie **30**, 77; 1909) in einigen Salix- und Populus-Arten aufgefunden; ein arbutinspaltendes Enzym fand er in Calluna vulgaris und Vaccinium myrtillus.

Gease nennen Bourquelot und Hérissey (C. r. **140**) ein spezifisches Enzym aus Geum urbanum und rivale L., welches aus einem darin enthaltenen Glukosid Eugenol freimacht.

Rhamnase spaltet Xanthorhamnin. Nach G. und Ch. Tanret (Bull. Soc. Chim. (3) **21**, 1065; 1899) spaltet sich das Xanthorhamnin in Rhamninose und Rhamnetin. Die Rhamninose ihrerseits wird als ein Trisaccharid angesehen, welches sich in Rhamnose (Methylpentose) und Galaktose spalten lässt. Kommt in Rhamnus infectoria vor.

Ausser diesen Glukosid-Enzymen kennen wir eine Reihe anderer, welche die eine oder andere Glukosidgruppe in spezifischer Weise spalten.

Myrosin zerlegt Sinigrin oder myronsaures Kalium in Traubenzucker, saures Kaliumsulfat und Allylsenföl nach der Gleichung:

$$C_{10}H_{18}NKS_2O_{10} = C_3H_5CNS + C_6H_{12}O_6 + KHSO_4$$
Sinigrin Allylsenföl Glukose.

Ebenso werden andere in Cruciferen vorkommende schwefelhaltige Glukoside durch Myrosin gespalten; α- und β-Glukoside werden aber nach E. Fischer (Chem. Ber. **27**) nicht angegriffen.

Vorkommen. Die Verbreitung des Myrosins kennt man durch die Arbeiten von Spatzier und besonders von Guignard (C. r. **111**, 249 und 920; 1890; ferner Journ. de Bot. 1893 und 1894 u. ff.). Es ist charakteristisch für Cruciferen und einige nahestehende Familien und findet sich ferner in Manihot-Arten. Es ist lokalisiert in besonderen, eiweissreichen Zellen, welche in den Geweben zerstreut auftreten. Guignard hat derartige Zellen und Zellenschichten, z. B. das Pericykel bei Cheiranthus mechanisch herauspräpariert. Wurzeln enthalten das Enzym hauptsächlich in der Rinde. Im Stamm trifft man Myrosin besonders im Pericykel. Sehr myrosinreich sind oft Blätter, wo das Enzym im jungen Mesophyll vorkommt.

Gifte und Antiseptika: Tannin soll die Wirkung des Myrosins schon in 1%iger Lösung hemmen, ebenso Salicylsäure in stärkeren Lösungen als 1,5%. Wenig schädlich ist 1%iges Chloral, ganz unschädlich Borax. Vergl. Windisch-Green (Enzyme, S. 156).

Erythrozym hat man ein Enzym genannt (Schunck 1852), welches das Ruberythrin oder die Ruberythrinsäure der Krappwurzel in Alizarin, Dioxyantrachinon und Glukose spaltet. Die gleiche Hydrolyse wird auch durch Emulsin, wenn auch langsamer, hervorgerufen, so dass Erythrozym mit einem Bestandteil des Emulsins vermutlich nahe verwandt oder identisch ist.

Indigo-Enzyme. Bréandat hat in den Blättern von Isatis alpina ein Enzym gefunden, welches Indikan, das Glukosid des Indoxyls in Indoxyl und einen Zucker (Indiglucin) zersetzen soll. Nach Beijerinck (Malys Jahrb. 1900) existiert ein Enzym, welches das mit dem Indikan nahe verwandte Isatan (aus Isatis tinctoria) zu spalten vermag.

Lotase aus Lotus arabicus spaltet das Glukosid Lotusin in Lotoflavin (1, 3, 3'5'-Tetraoxyflavon), Glukose und Blausäure. Nach Dunstan und Henry (Proc. Roy. Soc. **67**, 224; 1901, und **68**, 374; 1901) ist es von Emulsin verschieden.

Laktase. Dieses Enzym spaltet, wie S. 5 erwähnt, Milchzucker in d-Galaktose und d-Glukose und nach E. Fischer allgemein β-Galaktoside. Diese Wirkung scheint streng spezifisch zu sein, indem weder α- noch β-Glukoside durch Laktasen gespalten werden. Maltase und Laktase vertreten sich in verschiedenen Hefearten (E. Fischer, H. **26**), Pilzen (Bourquelot und Hérissey) und sind fast niemals gleichzeitig beobachtet worden. Eine Ausnahme bildet Eurotiopsis Gayoni, welcher nach Laborde (Ann. Inst. Pasteur **11**, 1; 1867) sowohl Maltose als Laktose angreift.

Vorkommen. Von Beijerinck (Zentralbl. f. Bakt. **6**, 44; 1889) in Milchzuckerhefen angenommen, aber streng erst durch E. Fischer (Chem. Ber. **27**, 3481; 1894) darin nachgewiesen. Im tierischen Organismus nicht sehr verbreitet; die Darmschleimhaut des Menschen,

des Kalbes und Hundes soll Laktase enthalten, allerdings nur im jugendlichen Alter; im Darmsaft der ausgewachsenen Menschen findet man keine Laktase (Hamburger und Hekma, Journ. Phys. Path. 4, 805; 1902). Im Pankreas fand Weinland (Z. f. Biol. 38) dieses Enzym. Laktase dürfte auch in allen denjenigen Bakterien vorkommen, welche den Milchzucker unter Bildung von Milchsäure und Alkohol zerlegen; die intermediär gebildeten Hexosen müssen nämlich durch Vermittlung dieses Enzyms entstanden sein. Fuhrmann (Vorles. über Bakterienenzyme S. 96) erwähnt besonders Bacillus acidi laevolactici und Bacterium coli.

Darstellung. (Fischer, Chem. Ber. **27**, 2991 und 3481). Die lufttrockene Hefe wird mit Glaspulver sorgfältig verrieben, mit der 20fachen Menge Wasser 20 Stunden bei 30—35° digeriert und die Flüssigkeit filtriert, passend durch ein Pukallsches Tonfilter. Die so bereitete Enzymlösung besass unzweifelhaft die Fähigkeit, Milchzucker in Hexosen zu verwandeln, aber ihre Wirkung war schwächer als diejenige, welche durch Extraktion von Kefirkörnern mit Wasser erhalten wurde.

Melibiase. Die Melibiose, ein Spaltprodukt der Melitriose oder Raffinose zerfällt bei weiterer Hydrolyse in d-Galaktose und d-Glukose; sie enthält also die gleichen Komponenten wie die Laktose. Die Hydrolyse lässt sich bewerkstelligen durch ein Enzym, welches in einigen Unterhefen, aber nicht in Oberhefen vorhanden ist. Das Enzym steht der Maltase sehr nahe und ist vielleicht als eine Maltase zu betrachten (Fischer, H. **26**, 81; 1898).

Invertase.

Invertin, Sucrase verdankt bekanntlich seinen Namen der Fähigkeit, Rohrzucker in Invertzucker (= Glukose + Fruktose) zu verwandeln. Der Wirkungsbereich der Invertase erstreckt sich auf alle synthetischen α-Methylfruktoside; dagegen widerstehen sowohl β-Methylfruktoside als α-Glukoside und α-Galaktoside der Spaltung. Abgesehen von diesen synthetischen Glukosiden greift Invertase die Gentianose an, ein Trisaccharid aus Gentiana lutea, welches sie in Fruktose und Gentiobiose spaltet. Auch die Melitriose, ein Trisaccharid des Rübenzuckers wird von Invertase zerlegt, und zwar in Fruktose und Melibiose.

Vorkommen. Die Verbreitung der Invertase in den Hefen ist ebenso bekannt als wichtig; sie wird in der Mehrzahl der Fälle von Maltase, in den Milchzuckerhefen von Laktase begleitet. Ausschliesslich Invertase dürften nur wenige Hefen enthalten, darunter Saccharomyces Marxianus (Fischer, H. **26**).

Von anderen niederen Organismen, welche Invertase enthalten, seien genannt Fusarium, Streptococcus (Leuconostoc) mesenterioides, Aspergillus Oryzae und Monilia candida. Auch eine grosse Reihe Invertase enthaltender Bakterien ist bekannt, besonders durch die Arbeiten von Fermi und Montesano (Zbl. f. Bakt. II. 1; 1895).

Bei höheren Pflanzen findet man Invertase besonders in grünen Blättern und jungen Baumtrieben (Kastle und Clark, Amer. Chem. Journ. **30**), in reifen Bananen, in Maulbeeren, in ruhendem und noch reichlicher in keimendem Pollen, in Weizen- und Gerstenembryonen; in den Kronenblättern von Robinia viscosa und pseudacacia, Papaver rhoeas, Rosa-Arten und in Bougainvillea-Brakteen. Ferner in Früchten, wie z. B. Datteln, wo sich Invertase vor dem Zustand der Reife als unlösliches Endoenzym findet, welches erst bei der Reife löslich wird (Vinson, J. Amer. Chem. Soc. **30**, 1005; 1908).

Invertase fand man im menschlichen Darmsaft, auch bei Neugeborenen (Krüger), nicht im Darmsaft des Rindes (Fischer und Niebel). Robertson fand es in fast allen Organen.

Darstellung. Will man die Hefezellen mit Wasser extrahieren, so ist es notwendig, dieselben vorher abzutöten, sei es durch kürzere Behandlung mit Äther oder durch längere Behandlung mit Alkohol (Osborne, H. **27**) und dergl., sei es durch Erhitzen der trockenen Hefe auf 105° (Salkowski), sei es durch Plasmolyse (Issaew).

O'Sullivan und Tompson liessen die obergärige Bierhefe einen Monat bei 15° stehen, bis sie sich vollständig verflüssigt hatte, und pressten die flüssige Masse aus, wobei man eine klare Lösung erzielt; dieselbe wurde mit 47%igem Alkohol gefällt. Es entstand ein massiger Niederschlag, welcher nach dem Absetzen wieder in Wasser gelöst wurde. Setzte man dann so viel Alkohol zu, dass die Flüssigkeit 28%ig wurde, so blieb die Invertase in Lösung, während der Hauptteil der Eiweisskörper ausfiel. Wird die abfiltrierte Flüssigkeit wieder mit Alkohol zum Gehalt 47% versetzt, so tritt von neuem ein Niederschlag auf, welcher mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Das so erhaltene Präparat war sehr aktiv, aber noch nicht rein; es enthielt noch etwa 5% Asche (Phosphate des Magnesiums und Kaliums), welche die englischen Forscher als Beimengungen betrachteten. Aus ihren weiteren Reinigungsversuchen ergab sich, was schon aus den Arbeiten von Osborne (H. **28**) und Salkowski hervorzugehen schien, dass Invertin kein Eiweisskörper ist. Auch die reinsten Präparate enthielten ausser Phosphorsäure noch ein Kohlehydrat. Wroblewski sieht dasselbe als Verunreinigung an, ebenso Oshima (H. **36**); letzterer kam zum Schluss, dass der Hefegummi aus einer Substanz besteht, welche neben d-Mannose ein Methylpentosan enthält, das bei Spaltung Fukose liefert.

Hafner, dem man eine gründliche Untersuchung über Reininvertin verdankt (H. **42**), hält es für keineswegs bewiesen, dass nicht dieses eigentümliche Kohlehydrat, das stets dem Invertin anhaftet, einen integrierenden Bestandteil desselben bildet. Ein grosser Teil des Phosphors der Invertinpräparate ist organisch gebunden. Die spezifische Wirksamkeit des Ferments ist nicht gebunden an das Vorhandensein grosser stickstoffhaltiger Gruppen wie die Albumosen und Peptone; gegen die Anwesenheit von Peptonen spricht ferner das Fehlen der Biuretreaktion. Der Stickstoffgehalt ist wahrscheinlich durch die Gegenwart kleinerer stickstoffhaltiger, noch nicht näher bestimmter Gruppen bedingt.

Auch aus Reinkulturen von Aspergillus niger lassen sich sehr wirksame Invertase-Lösungen gewinnen.

Die Temperaturempfindlichkeit der Invertase ist sehr gross, ihr Wirkungsoptimum wird zu 53—56° angegeben, hierbei wird die Invertase durch den

Rohrzucker geschützt. In wässriger Lösung soll die Tötungstemperatur schon bei 45—50° liegen. Den Einfluss der Azidität der Lösung hat Sörensen sehr eingehend behandelt (vergl. Kap. IV).

Giftig wirken Quecksilbersalze, Cyankalium (wie überhaupt alle alkalisch reagierenden Salze), wenig schädlich sind Blausäure, Chloroform, Thymol, unschädlich Toluol.

Phytase.

Ein Enzym, welches Phytin, Inosithexaphosphorsäure, $C_6H_6[OPO(OH)_2]_6$ in Inosit und Phosphorsäure spaltet, haben N. Suzuki, Yoshimura und Takaishi aus Reis- und Weizenkleie gewonnen (Bull. Coll. Agr. Tokyo **7**). Das Präparat war selbst phosphorfrei und spaltete weder Amylose noch Eiweissstoffe. Vermutlich ist das Enzym ebenso wie das Phytin im Pflanzenreich ziemlich verbreitet. Nach Mc. Callum und Hart (Journ. of Biol. Chem. **4**, 497; 1908) ist Phytin auch in der Leber und im Blut enthalten; es findet sich dagegen nicht im Muskel- und Nierenextrakt.

Pektase.

Es ist zweifellos am rationellsten, den Namen Pektasen für diejenigen Enzyme zu wählen, welche Pektosen in Pektin und Pektinsäuren überführen. Bei dem genannten Vorgang entsteht auch Arabinose. Die Reaktion besteht also zweifellos in einer Hydrolyse; die gebildeten Pektinsäuren findet man in den Pflanzen als Calciumsalze; näheres über die chemischen Vorgänge bei dieser Spaltung ist nicht bekannt. Auf die Arbeiten von Mangin (C. r. 1888—1893) und Devaux (Soc. phys. nat. de Bordeaux **3**) kann nur verwiesen werden. Dieses hier Pektase genannte Enzym haben Bourquelot und Hérissey (C. r. **127**; Journ. Chim. Phys. **9**) aus Malzextrakt gewonnen und als Pektinase bezeichnet. Indessen dürfte es sich empfehlen, diesen Namen nach dem allgemeinen Prinzip, das Substrat der Nomenklatur zugrunde zu legen, in Pektase umzuändern.

Pektinase.

Als Pektinase wollen wir hingegen dasjenige Enzym bezeichnen, welches gelöste Pektinstoffe z. B. in Fruchtsäften in Gegenwart von Kalk zu gallertartigen Calciumsalzen der schwach sauren Pektinsäuren koaguliert. Auch diese chemische Reaktion ist noch nicht näher aufgeklärt. Grössere Säurekonzentrationen hemmen oder verhindern vollständig die Koagulation, welche deshalb oft bei sauren Fruchtsäften erst nach der Neutralisation mit Kalk eintritt. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird durch ein gewisses Gleichgewicht zwischen dem Enzym, der Konzentration der Säure und derjenigen der Calciumsalze bedingt. Ohne Mitwirkung des Enzyms vermag der Kalk Pektine nicht zu Calciumpektaten zu koagulieren; lösliche Calciumsalze

können zwar Pektine zur Koagulation veranlassen, jedoch soll hierbei ein anderes Produkt entstehen, nämlich ein in 0,2%iger Salzsäure lösliches Pektinat. Zum Unterschied von diesem liefert Calciumpektat mit 0,2%iger Salzsäure unlösliche Pektinsäure: Bertrand und Mallèvre, denen man eingehende Untersuchungen über dieses Enzym verdankt (C. r. **119—121**), nennen — was wohl zu beachten ist — dieses Enzym Pektase.

Vorkommen: Findet sich in beinahe allen Pflanzen, besonders in jungen, rasch wachsenden Organen, Schösslingen, Blättern, Wurzeln und Früchten. Besonders reichlich und in augenblicklich wirksamem Zustand tritt das Enzym auf im Extrakt von Klee und Luzerne, sowie in den Blättern von Kartoffelpflanzen, Raps u. a.

Carbamasen.

Unter den proteolytischen Enzymen unterscheiden wir drei Enzyme oder Enzymgruppen: Das Enzym des Magensaftes, Pepsin, das Enzym des Pankreas, Trypsin und das Enzym der Darmschleimhaut, Erepsin. Sehr wahrscheinlich stellen diese drei Stoffe keine Individuen dar, sondern sind als Mischungen aufzufassen von Enzymen, welche noch spezifischer auf gewisse Eiweisskomplexe wirken. Jedenfalls können diese drei Enzymgruppen leicht voneinander unterschieden werden. Schwieriger gestaltet sich die Einteilung bei den pflanzlichen Proteinasen, wo weder die Lokalisation noch das Medium Anhaltspunkte zur Systematik liefern. Man kann deswegen kaum von Pflanzenpepsinen und Pflanzentrypsinen sprechen; die einzige Einteilung könnte gegenwärtig getroffen werden durch eine Abtrennung der Pflanzenpeptasen von den eigentlichen Proteinasen; indessen ist auch diese Scheidung vorläufig schwer durchführbar.

Pepsin.

Die Spaltung der Eiweissstoffe, welche das Pepsin ausführt, erstreckt sich, soweit bekannt, auf alle Proteine; als Abbauprodukte findet man Albumosen und Peptone; die Hydrolyse ist somit unvollständig, niedere Polypeptide und Aminosäuren treten im allgemeinen nicht auf. (Abderhalden und Rostocki, H. **44**, 265; 1905.)

Vorkommen: Im Magensaft, und zwar bei allen darauf untersuchten Rückgrattieren mit Ausnahme einiger Fische. In der Magenschleimhaut findet sich Pepsin nicht in aktiver Form, sondern als Proenzym (Pepsinogen). Existiert schon bei neugeborenen Kindern und kommt auch bei einigen Pflanzenfressern schon vor der Geburt in der Schleimhaut vor, fehlt aber bei der Geburt bei den bisher untersuchten Fleischfressern Hund und Katze. Pepsinähnliche, in saurer Lösung wirksame, proteolytische Enzyme sind bei mehreren Evertebraten gefunden worden; diese Enzyme sind wenigstens nicht bei allen Tieren mit dem gewöhnlichen Pepsin identisch.

Darstellung: Sehr wirksame und haltbare Pepsinlösungen erhält man durch Extraktion der Magenschleimhaut mit Glycerin. Hieraus kann das Pepsin zusammen mit Eiweiss durch Alkohol gefällt werden. Auch mit an-

gesäuertem Wasser lässt sich der Magenschleimhaut viel Pepsin entziehen. Das beste Ausgangsmaterial ist nunmehr reiner Magensaft, welcher nach der bekannten Pawlowschen Methode von Fistelhunden geliefert wird.

Die Reinigungsversuche haben bis jetzt auch beim Pepsin zu keinem endgültigen Resultat geführt. Als Ausgangsmaterial für die Reindarstellung kommt in erster Linie der nach Pawlow dargestellte Magensaft in Betracht.

Hieraus das Enzym rein darzustellen haben sich besonders Nencki und Sieber (H. **32**, 231; 1901) und Pekelharing (H. **35**, 8; 1902) bemüht.

Nach Pekelharing wird Pawlowscher Magensaft bei 0^0 20 Stunden dialysiert; dabei setzt sich Pepsin in Form durchsichtiger Kügelchen am Dialysator ab. Die trübe Flüssigkeit wird zentrifugiert, der farblose Bodensatz abgepresst und getrocknet; nach Pekelharings Meinung stellt derselbe reines Pepsin dar.

Hinsichtlich der Zusammensetzung des Enzyms ergeben die beiden genannten Arbeiten:

	% C	H	N	S	Cl	P	Fe	Asche
Nencki-Sieber:	51,26	6,74	14,33	1,5	0,48	klein	schwankend	0,57
Pekelharing:	51,99	7,07	14,44	1,63	0,49	0	+	0,1

Nach Nencki-Sieber ist Pepsin an Lecithin gebunden. Beim Kochen mit Säuren entsteht aus Pepsin eine Albumose und ein Nukleoproteid, das seinerseits Purinbasen (Pekelharing findet Xanthin) und Pentosen liefert (Friedenthal; Engelmanns Arch. f. Physiol. **24**, 181; 1900).

Das Pepsinmolekül soll (durch drei verschiedene Gruppen) die drei Funktionen des Magensaftes: Eiweissverdauung, Labung und Plasteinbildung vermitteln, eine Auffassung der sich Pekelharing anschliesst.

Der durch Hitzegerinnung aus Magensaft entstehende Niederschlag enthält nach Pekelharing eine Säure — Pepsinsäure — von der prozentischen Zusammensetzung C = 50,79; H = 7,0; N = 14,44; S = 1,08; dieselbe zeigt Millons und Biuretreaktion.

Formaldehyd greift „Pepsin“ nicht an, was Bliss und Novy veranlasst, an der Eiweissnatur des Pepsins zu zweifeln. Dass es übrigens möglich ist, Pepsinlösungen zu bereiten, welche Eiweiss kräftig verdauen und dennoch die Reaktionen von Eiweiss nicht zeigen, geben sowohl Nencki-Sieber als Pekelharing zu. Bereits 1885 hatte Sundberg kräftig wirkende Pepsinlösungen erhalten, welche keine Eiweissreaktionen gaben (H. **9**; vergl. auch Brücke, Wiener Sitz. Ber. **43**).

Die Darstellung einer eiweissfreien, äusserst energisch verdauenden, aber nicht labenden Pepsinlösung beschreibt Schrumpf (Hofm. Beitr. **6**, 396; 1905). Aus frischen Schweinemagen wird die abpräparierte Schleimhaut zerhackt, mit Kieselgur verrieben und unter hohem Druck ausgepresst; der

Presssaft wird durch eine Kitasatokerze geklärt und bleibt auf Zusatz von Uranylacetat, Ammoniumsulfat etc. klar.

Einen Beweis für die entgegengesetzte Ansicht, dass Pepsin eine echte Proteinsubstanz sei, hat Herlitzka (Atti R. Acad. d. Lincei [5] **13**, II, 51; 1904) aus dem Umstand herleiten wollen, dass Pepsin in Abwesenheit von Salzsäure allmählich seine Wirksamkeit verliert, während gleichzeitig Peptone auftreten. Da diese auch von Beimengungen herrühren können, sagen diese Versuche über die chemische Natur des Pepsins nichts aus.

Was die Einheitlichkeit des Pepsins betrifft, so wurde bereits erwähnt, dass das gleiche Molekül durch andere Seitenketten ausserdem noch labend und plasteinbildend wirken soll, eine Hypothese, welche mit den bis jetzt bekannten Tatsachen nicht unvereinbar ist. Vergl. auch Jacoby (Bioch. **1**, 53; 1906). Dagegen sind gegen die Annahme Pawlows, dass die Labwirkung eine Umkehrung der Pepsinwirkung sei, berechtigte Einwände erhoben worden (Bang, H. **43**; Schmidt-Nielsen, H. **48**; vergl. besonders Hammarsten, H. **56**).

Seiner chemischen Natur nach scheint das Pepsin eine Säure zu sein. Dafür spricht eine Anzahl mit verschiedenen Methoden und durch verschiedene Forscher angestellter Beobachtungen. Jacoby (Biochem. Z. **4**, 471; 1907) fand, dass das Pepsin wie auch das Lab alkalilöslich ist, und Adsorptionsversuche, die Michaelis beschreibt, ergeben eine ausgesprochene Adsorption durch basische Adsorptionsmittel. In Übereinstimmung hiermit steht die Beobachtung, dass Pepsin zur Anode wandert.

In alkalischem Medium ist Pepsin inaktiv, gewinnt aber nach dem Ansäuren seine Wirksamkeit mehr oder wenig vollständig wieder, je nach Art und Dauer des vorausgegangenen alkalischen Zustandes (Tichomirow, H. **55**).

Wirkungsoptimum bei 40°. Die Beständigkeit ist grösser in saurer als in neutraler Lösung und wird durch die Gegenwart von Salzen noch erhöht.

Trypsin.

Das in alkalischer oder neutraler Lösung wirksame Enzym des Pankreas baut die Eiweisskörper bis zu Aminosäuren oder wenigstens zu niedrigen Polypeptiden ab. Es spaltet nicht alle Dipeptide, vermutlich nur die im Organismus vorkommenden Kombinationen (vergl. Kap. VIII). Nicht angegriffen werden Säureamide, Hippursäure u. a. (Gulewitsch, H. **27**; Schwarzschild, Hofm. Beitr. **4**; Fischer und Bergell, Chem. Ber. **36** und **37**). Aus Nukleoproteiden wird die Eiweisskomponente von der Nukleinsäure abgetrennt und weitergespalten.

Vorkommen. Sowohl im Pankreassaft als im Gewebe der Pankreasdrüse und zwar als Proenzym, welches durch spezifische Aktivatoren oder Kinasen in den aktiven Zustand übergeführt wird.

Trypsine oder Tryptasen hat man in allen darauf untersuchten Wirbeltieren gefunden. Hedin (Journ. of Physiol. **30**) hat ein tryptisches Enzym im normalen Blutserum entdeckt; es wirkt in alkalischem Medium und spaltet Kasein, Gelatine und koaguliertes Serumeiweiss; dagegen werden Globuline und koaguliertes Eieralbumin nicht angegriffen. Ausser im Pankreas finden sich tierische Tryptasen im Harn, in der Milz und in anderen Organen; ferner im Hühnerei.

Darstellung. Kräftige aber unreine Lösungen erhält man durch Extraktion von feingehackter Pankreasdrüse mit Chloroformwasser. Das beste Material bildet der nach Pawlows Methode gewonnene Pankreassaft, welcher durch Darmsaft aktiviert werden muss.

Die Reinigung des Trypsins ist in neuerer Zeit besonders von Mays H. **38** und **49**) versucht worden. Derselbe kam zu einem verhältnismässig sehr reinen und wirksamen Präparat durch Aussalzen der Trypsinlösung mit NaCl und $MgSO_4$; über die chemische Natur des Trypsins konnten jedoch auch diese Untersuchungen wenig Aufschluss geben. Es ist kein Nukleoproteid und gibt nicht die Biuretreaktion (Mays, Schwarzschild).

In wässriger Lösung sehr labil und wärmeempfindlich, und zwar in alkalischer Lösung mehr als in neutraler. Substrat und Spaltprodukte schützen erheblich (Bayliss, Vernon), so dass die Optimumtemperatur zu 40° angegeben wird. Trypsinogen ist weniger wärmeempfindlich als Trypsin. Säuren denaturieren schon in schwacher Konzentration. Im Gegensatz zu Pepsin, welches alkalilöslich ist, löst sich Trypsin in Säuren. Im elektrischen Feld verhält es sich wie ein amphoterer Elektrolyt, d. h. es wandert je nach der Reaktion der Lösung anodisch oder kathodisch.

Wenig empfindlich gegen Chloroform und Thymol.

Glutinase hat Pollak (Hofm. Beitr. **6**, 95; 1905) als besonderes Enzym durch seine Widerstandsfähigkeit gegen Säuren charakterisieren wollen. Es soll nur auf Leim, nicht aber auf gewisse andere Eiweisskörper wirken.

Dagegen haben aber Ascoli und Neppi (H. **56**) geltend gemacht, dass die Spezifität der Glutinase gegenüber Leim nur scheinbar ist und nur darauf beruht, dass die verschiedenen Eiweisskörper durch Paralysatoren und Aktivatoren verschieden beeinflusst werden.

Erepsin.

Cohnheim (H. **33**, **35**, **36** und **49**). Zerlegt Albumosen, Polypeptide, Peptone und Protamine vollständig in Aminosäuren. Proteine werden mit Ausnahme des Kaseins nicht angegriffen, dagegen werden Nukleinsäuren (Nagayama H. **41**) gespalten.

Vorkommen. Im Darmsaft und in der Darmschleimhaut; letztere ist reicher an Enzym. Scheint, besonders nach den Untersuchungen von Vernon (Journ. of Physiol. **32**) und Abderhalden das meist verbreitete proteolytische Enzym zu sein; es konnte bei fast allen untersuchten Tieren nachgewiesen werden.

Darstellung. Nach Cohnheim aus dem Presssaft der Darmschleimhaut. Auch durch Extraktion derselben mit Glycerin oder Wasser erhält man sehr wirksame Lösungen. Aus der wässerigen Lösung salzt man das Ferment mit Ammoniumsulfat aus. Auch der Hefepresssaft enthält viel Erepsin (Abderhalden).

Die Optimaltemperatur soll bei 38° liegen (gemessen in alkalischer Lösung).

Proteolytische Enzyme der Pflanzen.

Proteinasen nennen wir diejenigen Enzyme, welche die eigentlichen Eiweisskörper abbauen. Die Spaltung scheint sich bis zu den Albumosen und Peptonen zu erstrecken. Selten dürften jedoch in denjenigen Pflanzenorganen, wo Eiweisskörper zerlegt werden, ausschliesslich Proteinasen zugegen sein, vielmehr dürften sie stets von Peptasen begleitet sein, welche den Erepsinen des Tierkörpers entsprechen. Vines (Ann. of Bot. **22**) hat tatsächlich neuerdings beide Enzyme im Samen von Cannabis sativa angetroffen.

Ausser in keimenden Samen finden sich Proteinasen in gewissen saftigen Früchten (Ficus carica) und Blättern (Agave). Allgemein ist das Vorkommen in insektenfressenden Pflanzen. Eingehender untersucht sind

Bromelin im sauren Ananassaft und

Papain oder Papayotin im Frucht-, Blatt- und Stammsaft von Carica papaya. Diese beiden Enzyme sind miteinander sehr nahe verwandt, wenn sie nicht vollständig identisch sind. Auch tierische Eiweisskörper, wie Fibrin, werden von Bromelin gespalten (Chittenden). Aus dem Gemisch proteolytischer Fermente in öligen Samen konnte Vines eine fibrinverdauende Proteinase isolieren. Ähnlich wirkt Carica-Papain, welches ebenfalls das Fibrin kräftig verdaut. Ausser Albumosen und Peptonen fand Emmerling nach der Verdauung von Fibrin mit Carica-Saft und mit einem papainähnlichen Enzym aus Bacillus fluorescens liquefaciens auch verschiedene Aminosäuren, wie Leucin, Tyrosin u. a. Mit „Papayotin Merck" erhielten Kutscher und Lohmann analoge Resultate, wodurch das oben erwähnte gleichzeitige Vorkommen von Proteinasen und Peptasen wahrscheinlich wird.

Die Angaben über die Azidität bezw. Alkalinität, in welcher die pflanzlichen Proteinasen ihre Optimalwirkung erreichen, weichen stark voneinander ab (vgl. Green, Vines, Emmerling, Weis u. a.), was teils auf der qualitativen und quantitativen Verschiedenheit des angewandten Substrats beruhen dürfte, teils auf der ungleichen Zusammensetzung der Enzympräparate; die darin enthaltene Peptase wird wohl stets in neutraler oder schwach alkalischer Lösung am besten wirken, die Proteinasen hingegen vorzugsweise in

saurer. Sehr reichlich kommen Proteinasen in Pilzen vor; sie können aus den Mycelien durch Wasser oder Glycerin extrahiert werden.

Extrazellulär treten Proteinasen in den insektenverdauenden Pflanzen auf. In diesen werden sie aus Zymogenen in bestimmten Drüsen erst durch Reizung mit stickstoffhaltigen Körpern freigemacht. Bei Nepenthes verbreitet sich das Enzym in dem antiseptischen, beinahe eiweissfreien Saft der Blattkannen. Dieser saure Saft spaltet Eiweissstoffe nicht nur in Albumosen, sondern auch in Aminosäuren (Vines, Ann. of Bot. 1897). Die Blattdrüsen von Dionaea und Drosera und der Blattrand von Pinguicula scheiden saure, schleimige Sekrete aus, welche sogar die Albuminoide der Knorpel- und Leimgewebe angreifen. Extrazellulare Proteinasen scheinen auch von Bakterien erzeugt zu werden, nämlich von denjenigen Arten, welche Gelatine zu verflüssigen imstande sind.

Eine andere Gruppe von Pilzproteinasen sind typische Endoenzyme; besonders bemerkenswert ist unter diesen die

Endotryptase der Hefe (Hahn und Geret). Ihre Wirkung erstreckt sich auf, soweit bekannt, alle Eiweisskörper (Gelatine, Fibrin, Kasein, Eieralbumin), welche sie bis zu den Aminosäuren abbaut. Sie lässt sich nicht durch Extraktion der Hefe mit Wasser gewinnen, sondern wird nur durch das Buchnersche Verfahren erhalten.

Im Gegensatz zu Papain soll Endotryptase in saurer Lösung am kräftigsten sein. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 40—45°.

Peptasen nennen wir diejenigen Enzyme, welche Albumosen, Peptone und Polypeptide zu Aminosäuren spalten. Sie begleiten meist die Proteinasen und finden sich reichlich in Samen von Lupinen, Raps, Erbsen und Mais, wie Vines (Ann. of Bot. **20**), Abderhalden und Schittenhelm (H. **49**) und Euler (H. **51**) gezeigt haben. Abderhalden und seine Mitarbeiter fanden sie ferner im Hefepresssaft.

Nach einigen Forschern, wie Weis (H. **31**) und Vines (Ann. of Bot. **17**, **18**) tritt die schnellste Hydrolyse in schwach saurer, nach anderen, z. B. Windisch, in schwach alkalischer Lösung ein.

Nukleasen.

Diese wichtige von Fr. Sachs und Iwanoff entdeckte Enzymgruppe spaltet die Nukleinsäuren in ihre Bestandteile, Purin- bezw. Pyrimidinbasen, Pentosen und Phosphorsäure.

Den Beweis für die enzymatische Natur der Nukleinzersetzung erbrachten besonders Salkowski (H. **13**) und für die Digestion des Buchnerschen Hefepresssaftes Hahn und Geret (Chem. Ber. **31**), und zwar wirken, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, auf die Nukleinsäuren eine grössere

Anzahl von Enzymen. Dieselben lassen sich in mehrere Gruppen teilen. (Vergl. ein Referat von B. Bloch, Biochem. Zbl. **5**, 561; 1907.)

1. Die Nuklease, welche die Phosphorsäure aus dem Nukleinsäuremolekül freimacht.
2. Hydrolysierende Enzyme, welche aus den Aminopurinen Ammoniak abspalten und die NH_2-Gruppe mit der Hydroxylgruppe ersetzen.
3. Oxydierende Enzyme, welche Oxypurine zu Harnsäure oxydieren.
4. Harnsäureoxydase.

Reines Trypsin wirkt nach Sachs (H. **46**) gar nicht auf Nukleinsäuren ein. Die Nukleinsäurespaltung ist nur in den frischen Pankreasauszügen zu beobachten, welche proteolytisch wenig wirksam sind.

Vorkommen. Recht häufig in tierischen Organen, z. B. in Milz, Leber (Jones), ferner in der Pankreas- und Thymusdrüse (vergl. Kutscher, H. **34**). Spielt auch in vielen Pflanzenorganen, ganz besonders in keimenden Samen eine wichtige Rolle beim Aufbau und Abbau der Nukleoproteide (Zaleski, Bot. Ber. **25**). Besonders zu erwähnen sind ausserdem die Nukleasen höherer Pilze (Kikkoji, H. **51**) und niederer Pilze (Iwanoff, H. **39**), besonders die Nuklease der Hefe.

Arginase (Kossel und Dakin, H. **41**).

Spaltet spezifisch Arginin in Harnstoff und Ornithin nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{l} NH_2 \cdot C(=NH) \cdot NH \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH + H_2O = \\ NH_2 \cdot CO \cdot NH_2 + NH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH \end{array}$$

Während die Trypsinspaltung sich durch das Schema $C—CO \vdots NH—C$ charakterisieren lässt, spaltet die Arginase die Bindung $— C \cdot \vdots \cdot NH —$

Vorkommen: In Leber, Niere, Thymus und Darmschleimhaut des Kalbes, ferner in Muskeln des Hundes und in Lymphdrüsen des Rindes.

Es kann den Organen durch Extraktion mit Wasser entzogen werden.

Urease.

Dieses Enzym spaltet Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak.

Vorkommen: Urease findet sich nach Leube (Virch. Archiv **100**) in Micrococcus ureae, aus welchem es leicht in die umgebende Flüssigkeit austritt.

Urease hat Lea (Journ. of Physiol. **6**, 136; 1885) rein darzustellen versucht; er hat aus Micrococcus ureae durch Behandlung mit Alkohol, Extraktion der Fällung mit Wasser und erneute mehrfache Alkoholfällungen ein Pulver erhalten, welches sich in Wasser klar löste, aber Eiweiss enthielt. Wie auch spätere Arbeiten gezeigt haben, wird Urease von lebendem Protoplasma sehr energisch zurückgehalten. Schittenhelm hat eine Fermentlösung (frei von Purinkörpern) aus der Niere erhalten.

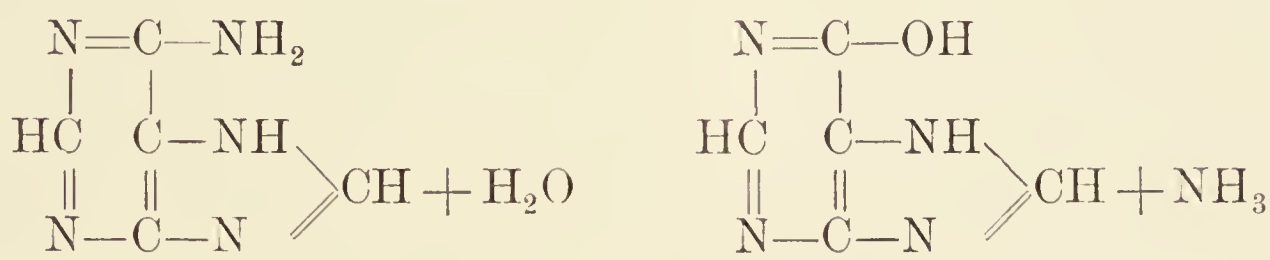
Desamidasen.

Während Spaltung der Proteine durch Trypsin und Erepsin bei den Aminosäuren stehen bleibt, greifen die Desamidasen letztere an und zerlegen sie in Ammoniak und Oxysäuren. Eine solche einfache Desamidierung tritt, wie H. Pringsheim (Biochem. Z. **12**) gefunden hat, durch Vermittlung eines in Acetondauerhefe enthaltenen Enzyms ein. Eine ähnliche Wirkung entfalten Dauerpräparate aus Aspergillus niger. Die von F. Ehrlich entdeckte sog. „alkoholische Gärung der Aminosäuren“ setzt sich aus zwei Reaktionen zusammen, nämlich aus der Desamidierung der Aminosäuren zu den entsprechenden Oxysäuren und aus der darauffolgenden Abspaltung von CO_2, so dass die ganze Reaktion formuliert werden kann:

$$R . CH(NH_2) . CO_2H + H_2O = R . CH_2OH + CO_2 + NH_3.$$

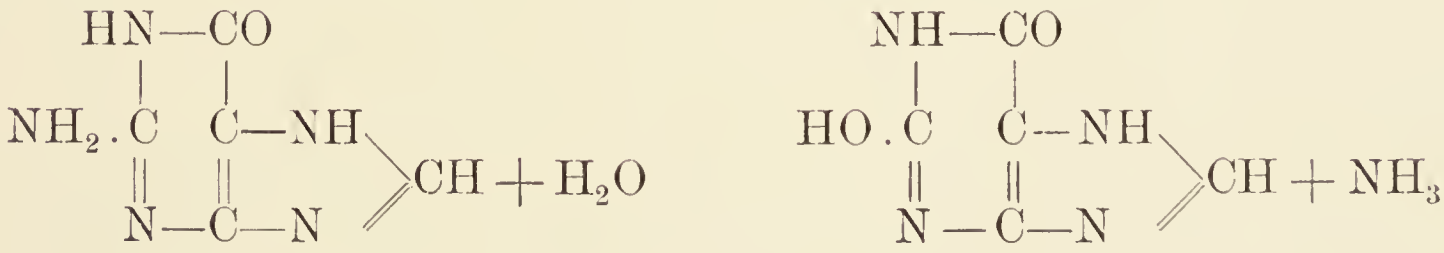
Im Prinzip ähnliche Reaktionen wie die Desamidase der Hefe führen die Enzyme aus, welche man als Guanase und Adenase bezeichnet hat. Sie verwandeln Guanin und Adenin in die entsprechenden Oxyderivate, Xanthin und Hypoxanthin.

Adenin ⟶ Hypoxanthin



und

Guanin ⟶ Xanthin



Über die Einheitlichkeit und die Wirkungsweise dieser Enzyme der Purinbasen gehen die Ansichten der verschiedenen Forscher, welche sich mit ihnen beschäftigt haben, auseinander. (Schittenhelm; H. **42**, **43**, **45**, **46**. — Jones und Mitarbeiter, H. **42**, **44**, **45**, **48**. — Siehe auch Burian, H. **43**). Wenn die beiden Enzyme nicht, wie Schittenhelm annimmt, ganz identisch sind, so stehen sie einander jedenfalls sehr nahe.

Vorkommen: Guanase und Adenase sind nachgewiesen in Pankreas, Milz, Lunge, Leber des Kindes, Schweines (nicht in der Schweinemilz) des Rindes, sowie in zahlreichen anderen Organen.

Darstellung. (Schittenhelm; H. **42**). Man extrahiert 1—2 Milzen mit etwa 2 Liter Wasser während etwa 12 Stunden, und fällt das Enzym mit $(NH_4)_2SO_4$. Die Fällung wird in Wasser gelöst und durch Dialyse vom Ammoniumsulfat befreit.

Koagulierende Enzyme.

Chymosin und Parachymosin sind diejenigen Enzyme, welche die Gerinnung der Milch bewirken, indem sie das Kasein derselben in noch unbekannter Weise verändern. Die beiden Enzyme unterscheiden sich durch ihr Vorkommen. Chymosin ist das längst bekannte Enzym des Kalbsmagens, von welchem nach Bang (Deutsche med. Wochenschr. 1899 und Pflüg. Arch. **79**) der koagulierende Bestandteil des Menschenmagens, das Parachymosin verschieden ist. Der chemische Verlauf der Labgerinnung ist noch unklar. In Lösungen, welche reines Kasein und möglichst reines Lab enthalten, findet man nach der Gerinnung im Filtrat in sehr kleiner Menge einen Eiweisskörper, das Molkeneiweiss, welches nur 13,2 % Stickstoff enthält. Die Hauptmenge des Kaseins fällt bei der Gerinnung als ein dem Kasein nahestehender Stoff, das Parakasein aus. Ob diese Tatsachen auf eine Spaltung des Kaseins hindeuten, ist noch ungewiss. (Vergl. Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie 6. Aufl. S. 522; 1907).

Vorkommen: Im Magensaft und in der Magenschleimhaut, im Pankreassaft und einigen anderen Organen vieler Tiere. Vielfach findet man das Enzym in inaktiver Form, als sog. Prochymosin, (Edmunds Journ. of Physiol. **19**. — Vernon, Journ. of Physiol. **27**), was wohl hauptsächlich auf dem Mangel an Aktivatoren beruht.

Die Aktivierung des Prochymosins kann durch Säuren augenblicklich bewirkt werden. Nach der Aktivierung ist Lab dann noch in neutraler und alkalischer Reaktion wirksam.

Darstellung. (Hammarsten, H. **56**, 18; 1908.) Neuerdings hat Hammersten die Darstellung von Chymosin aus Kalbsmagen, Pferdemagen, Hühnermagen und Hechtmagen beschrieben. Aus erstgenanntem Material gestaltet sich die Bereitung von Chymosin folgendermassen:

Der Labmagen wird von dem Darm und den drei anderen Mägen getrennt, längs der kleinen Curvatur aufgeschnitten und von dem Inhalte durch Ausspülen mit Wasser befreit. Dann schneidet man den Pylorusteil weg, und zwar so reichlich, dass wenigstens 3—5 cm von den grossen Falten des Fundusteiles mit weggenommen werden. (Der Pylorusteil liefert nämlich eine mehr schleimreiche Infusion, während er gleichzeitig weniger reich an Enzymen als der Fundusteil ist.) Der Rest des Magens wird ausgespannt und gründlich abgespült. Darauf schabt man mit dem Rande eines Uhrgläschens die Drüsenschicht ab, und zwar auf beiden Seiten je einer Falte, wägt die Masse und zerteilt sie in verdünnter Salzsäure von 0,1—0,2 % HCl. Es kommen hierbei auf je einen Gewichtsteil Drüsenmasse 10—20 ccm Säure. Man lässt die verdünnte Säure bei niedriger Temperatur, etwas über 0° 12—24 Stunden unter mehrmaligem Umschütteln einwirken und filtriert nach dieser Zeit. Nachdem man sich von der kräftigen Wirkung der neutralisierten Infusion überzeugt hat, fällt man mit Magnesiumcarbonat.

Man versetzt je 100 ccm Infusion mit etwa 1 g Magnesia, schüttelt damit und filtriert rasch, worauf auf Pepsin geprüft werden kann. (Vergl. Anhang: Arbeitsmethoden.) Enthält dann das Filtrat noch viel von diesem Enzym, so wird es nochmals mit Magnesia behandelt, und man wiederholt das Verfahren, bis man ein Filtrat erhält, welches Milch kräftig koaguliert, während es nur sehr schwach auf Fibrin wirkt.

Ein anderes von Hammarsten angegebenes Verfahren zur Darstellung von Chymosin besteht darin, dass man dieses Enzym, nachdem es mit $MgCO_3$ vom grössten Teil Pepsin befreit ist, mit Bleiessig fällt. Der Niederschlag wird durch Schwefelsäure von Blei befreit; das saure Filtrat wird mit einer Lösung von Cholesterin oder Stearinsäure in Alkohol und etwas Äther versetzt und umgeschüttelt, so dass das abgeschiedene Cholesterin bezw. die Stearinsäure das Enzym mit sich reisst. Wird nun der Niederschlag in Wasser aufgeschlämmt und mit Äther vom Fällungsmittel befreit, so erhält man eine ziemlich reine Chymosinlösung. Das reinste, solchermassen dargestellte Labenzym gab die gewöhnlichen Eiweissreaktionen nicht.

Was die Identität von Chymosin und Pepsin angeht, so stehen sich zwei verschiedene Ansichten gegenüber. Nach der einen, von Pawlow (H. **42**), Sawjalow (H. **44**), Sawitsch (H. **55**) und Gewin (H. **54**) vertretenen Ansicht rühren beide Wirkungen von einem und demselben Enzym her, und nach Sawjalow und Gewin soll die Milchgerinnung nichts anderes als der Anfang der Pepsinverdauung sein. Demgegenüber wird von Nencki und Sieber (H. **32**), Pekelharing (H. **35**), Schmidt-Nielsen (H. **48**), besonders aber von Hammarsten (H. **56**) betont, dass die beiden Enzyme nicht identisch, sondern verschiedener Art seien.

Ausser der oben angegebenen Cholesterinmethode hat Hammarsten neuerdings noch eine zweite Methode angegeben, welche die Trennung von Chymosin- und Pepsinwirkung gestattet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass man die saure Enzymlösung auf 40° oder eine etwas höhere Temperatur erwärmt. Das Kalbschymosin wird hierbei rascher als das Pepsin zerstört, und man kann folglich nach einiger Zeit eine Lösung erhalten, welche nicht mehr labend wirkt, während sie Eiweiss verdaut (l. c. S. 61).

Chymosin entfaltet eine ausserordentlich grosse Wirksamkeit. Mit 1 Teil Kalbsschleimhaut ist man imstande, 250000 Teile Milch zu koagulieren. Mit gereinigtem Chymosin erzielte Hammarsten Koagulation bei einem Gewichtsverhältnis von 1:24 Millionen; Fuld gibt ein Verhältnis von 1:30 Millionen an.

Chymosin labt nur in saurer Lösung; am besten fördert HCl, dann folgt Salpetersäure, Milchsäure, Essigsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure.

Optimaltemperatur 37—39°.

Durch Chloroform wird Chymosin geschädigt (Benjamin), durch Blausäure nicht (Fuld und Spiro).

Milchkoagulierendes Enzym in den Pflanzen (Cynarase). Eine Anzahl Pflanzen wie Pinguicula vulgaris, Galium verum, Artischocke, besitzen die Fähigkeit, die Milch fadenziehend zu machen.

Ob der chemische Vorgang, welcher dieser Koagulation zugrunde liegt, der gleiche ist, wie derjenige, welcher unter der Einwirkung von Chymosin eintritt, ist unbekannt.

Vorkommen: Ausser den genannten Pflanzen wirken milchkoagulierend: Lolium perenne, Anthriscus vulgaris, Plantago lanceolata, Lamium amplexicaule und hybridum, Philadelphus coronarius, Geranium molle, Capsella bursa pastoris, Ranunculus bulbosus, Medicago lupulina, Centaurea scabiosa u. a. Green (Proc. Roy. Soc. **48**) fand das Enzym in den keimenden Samen von Ricinus communis als Zymogen, welches durch verdünnte Säuren aktiviert wurde. Auch zahlreiche andere Samen enthalten dieses Enzym, so diejenigen von Datura, Pisum, Lupinus hirsutus. Weis (H. **31**) fand ein Labferment im Malz. Die milchkoagulierende Wirkung der Feige, Ficus carica, war bereits den alten Griechen bekannt. Siehe ferner Gerber (C. r. **148**, 992).

Schliesslich sind Labenzyme in vielen niedrigen Pilzen, unter anderen in Fuligo varians nachgewiesen worden.

Thrombin, Fibrinferment. (Alexander Schmidt, 1872.)

Thrombin bringt das Blut zum Gerinnen, indem es gelöstes Fibrinogen in unlösliches Fibrin verwandelt.

Der Vorgang der Blutgerinnung ist vermutlich folgender: Wenn das Blut den Körper verlassen hat, entsteht aus einem Bestandteil des Blutes (vielleicht den Leukozyten) ein Proenzym, welches sich unter dem Einfluss löslicher Kalksalze in das aktive Enzym verwandelt. Dieses Enzym führt dann das Fibrinogen ohne weitere Mitwirkung von Kalksalzen in unlösliches Fibrin über.

Die Darstellung geschieht am besten aus Blutserum oder defibriniertem Blut durch Fällen mit dem 15—20fachen Volumen Alkohol, wobei gleichzeitig die Eiweissstoffe abgeschieden werden. Extrahiert man dann den Niederschlag mit Wasser, so bleibt ein Teil des Eiweissstoffes ungelöst, während das Thrombin in Lösung geht. Nach dem Verfahren von Hammarsten (Pflüg. Arch. **18**) fällt man zunächst die Globuline durch Magnesiumsulfat; man verdünnt mit Wasser und fällt dann durch Natronlauge Magnesiumhydrat, das reichlich Fibrinferment adsorbiert enthält. Pekelharing dialysiert das Filtrat des mit Magnesiumsulfat gewonnenen Niederschlages. Aus Vogelmuskeln hat Fuld das Thrombin gewonnen durch Extraktion mit 0,8 prozentiger NaCl-Lösung.

Pekelharing hält das Thrombin, für die Kalkverbindung des im Blutplasma vorkommenden Nukleoproteids, des Prothrombins, um dessen Reindarstellung er sich bemüht hat (Verh. d. k. Akad. v. Wetenschappen

te Amsterdam (II,1) Nr. 3; 1892. — Zbl. f. Physiol. **9**; 1895). Die Existenz dieses Nukleoproteids im Blutserum steht fest, aber seine Zusammensetzung ist noch nicht eingehender erforscht, da die im Blut vorhandene Menge sehr gering ist. Hammarsten fand bei seinen eingehenden Untersuchungen in einer konzentrierten Fermentlösung, die 0,417 % organische und 0,166 % unorganische Substanz enthielt, nur 0,005 % Nuklein. Die Resultate seiner experimentellen Arbeiten macht Huiskamp (H. **32**) gegen die Auffassung von Pekelharing geltend. Huiskamp fand, dass sowohl das Nukleohiston, wie das andere Nukleoproteid der Thymusdrüse — zwei wesentlich verschiedene Stoffe — bei Gegenwart von Kalksalzen wie das Thrombin auf Fibrinogen wirkte. Nach ihm hat das Calciumnukleoproteid folgende Zusammensetzung: C = 49,82 %; H = 7,29 %; N = 15,81 %; P = 0,954 %; S = 1,188 %; Ca = 1,337 %. In einem Referat in den Ergebnissen der Physiologie **1** (I) 339; 1902) lässt Hammarsten indessen die Frage unentschieden, ob das Proteid selbst als das Fibrinferment zu betrachten ist, oder ob seine Wirkung auf die Fibrinbildung auf der Verunreinigung mit einer anderen Substanz beruht.

Optimaltemperatur für Thrombin ist 40°.

Zur Chemie der Butgerinnung siehe Morawitz, Erg. d. Physiol. **4**. — L. Loeb, Biochem. Zbl. **6**. — Pekelharing, Biochem. Zeitschr. **11**. —

Gärungsenzyme.

Gärung ist kein chemisch definierter Begriff; man versteht darunter solche Prozesse, welche durch niedere Organismen hervorgerufen werden, und zwar in einem Betrag, welcher bedeutend ist im Vergleich zur Masse der beteiligten Organismen.

Den hydrolysierenden Enzymen kann man die Gärungsenzyme nach einem chemischen Einteilungsprinzip insofern gegenüberstellen, als die typischen Gärungsreaktionen in reinen Spaltungen bestehen, also ohne Aufnahme von anderen Stoffen, wie Wasser oder Luftsauerstoff verlaufen; das bekannteste Beispiel bietet die alkoholische Gärung der Hexosen, welche durch die Zymase bewirkt wird. Dagegen rechnen wir also das Enzym der Essigsäuregärung nicht zur gleichen Gruppe, sondern zu den Oxydasen. Die den übrigen Gärungen zugrunde liegenden Reaktionen sind erst in neuester Zeit Gegenstand eingehenderer chemischer Studien geworden — es sei hier besonders an die Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer erinnert; die an diesen Gärungen vermutlich beteiligten Enzyme sind noch nicht nachgewiesen. Die Einsicht, dass Gärungen überhaupt auf Enzymwirkungen zurückzuführen sind, ist eine Folge der Entdeckung von E. Buchner, welchem es 1897 gelang, die alkoholische Gärung in einem zellfreien Hefepresssaft nachzuweisen und somit die Unabhängigkeit derselben von der Lebenstätigkeit der Hefe zu zeigen.

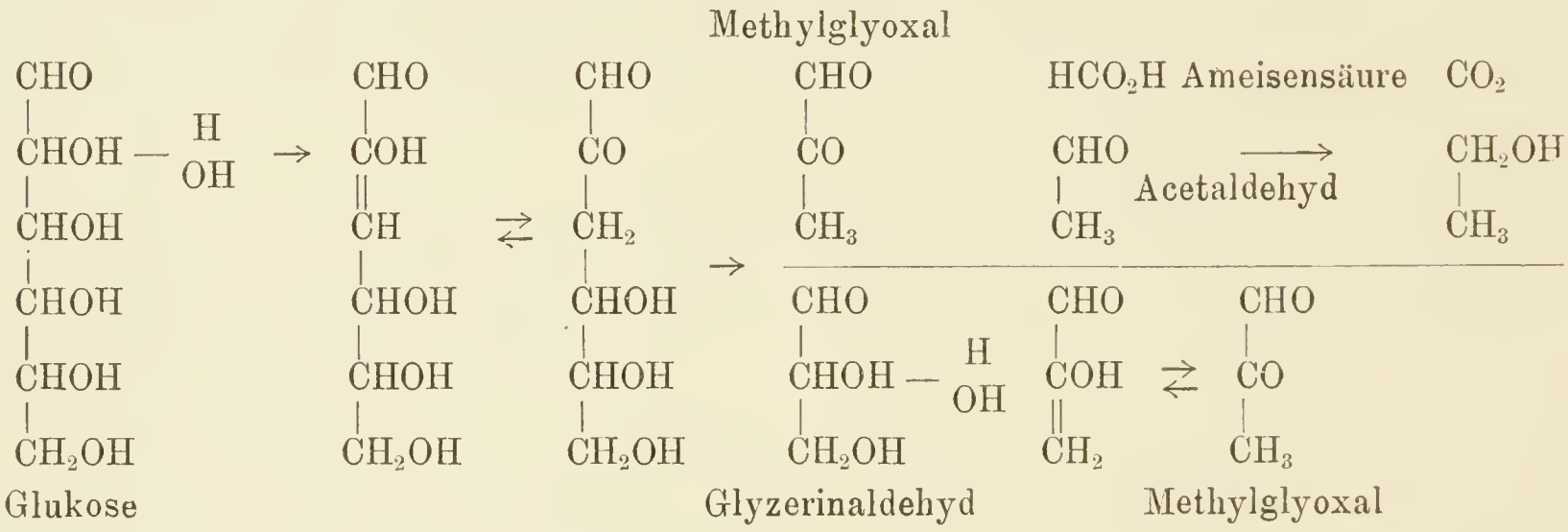
Enzyme der alkoholischen Gärung.

Als Zymase im weiteren Sinne bezeichnet man das Enzym, welches die Spaltung gewisser Hexosen nach folgender Gleichung veranlasst:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

d-Hexose Äthylalkohol

Mit Buchner und Meisenheimer und Wohl nimmt man an, dass der durch obige Formelgleichung dargestellte chemische Vorgang in mehrere Einzelreaktionen zerfällt. Man hat geglaubt, dass aus dem Traubenzucker Milchsäure entsteht, und zwar unter Vermittlung eines Enzyms, welches als Zymase im engeren Sinne bezeichnet wird. Neuere Untersuchungen haben es indessen wahrscheinlich gemacht, dass nicht die Milchsäure, wohl aber eine nahe Vorstufe derselben als Zwischenprodukt bei der Gärung auftritt, welche dann vielleicht folgende Phasen durchläuft:



Unsicher ist übrigens auch das Auftreten von Methylglyoxal, welches mit Hefepresssaft noch nicht vergoren werden konnte. Von Boysen-Jensen (Bot. Ber. **26**) ist Dioxyaceton, ein Isomeres des Glyzerinaldehyds als Zwischenprodukt angenommen worden.

Bemerkenswert ist, dass die Umwandlung von Glukose in Alkohol + Kohlensäure auch auf rein chemischem Wege durchgeführt werden kann, wobei allerdings verschiedene Katalysatoren zu den verschiedenen Reaktionen erforderlich sind.

Glukose → Milchsäure (Alkali als Katalysator)

Milchsäure → Acetaldehyd + Ameisensäure (Schwefelsäure als Katalysator)

Acetaldehyd + Ameisensäure → Alkohol + CO_2 (Rhodium als Katalysator).

Buchner, Meisenheimer und Schade (Chem. Ber. **39**; Schade, Biochem. Z. **7**).

Als Gärungssubstrat kann ausser Glukose auch Mannose, Galaktose und Fruktose dienen. Glukose und Fruktose zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der Spaltungsgeschwindigkeit, und Mannose weicht wenig davon ab.

Galaktose hingegen wird nur von gewissen Hefearten vergoren, von untergäriger Bierhefe und ihrem Presssaft viel langsamer als Glukose (E. Fischer und Thierfelder, Chem. Ber. **27**).

Vorkommen: Zymasen kommen nicht nur in Hefepilzen vor, sondern sind im ganzen Tier- und Pflanzenreich ausserordentlich verbreitet. Es kann kaum mehr bezweifelt werden, dass die Zuckerverbrennung im tierischen Organismus, wie auch in höheren Pflanzen mit Spaltungen beginnt, welche der durch die Hefe verursachten vollständig analog sind. Erst in der letzten Phase der Reaktion tritt ein Unterschied ein, indem bei der normalen Veratmung von Zucker weder in Tierorganen noch in Pflanzen Alkohol gebildet wird. Dagegen ist die intramolekulare Veratmung von Zucker mit der alkoholischen Gärung vollständig identisch. Man verdankt diese Einsicht, was höhere Pflanzen betrifft, besonders E. Godlewski, Palladin und Kostytschew. Auch der als Glykolyse bezeichnete Vorgang im Tierkörper dürfte der Gärung sehr nahe stehen.

Tierische glykolytische Enzyme oder Zymasen sind besonders aus Blut und Milz, aus dem Pankreasgewebe und aus Muskel dargestellt worden.

Frau N. Sieber hat drei glykolytische Enzyme aus Blutplasmafibrin und aus Milz als gut haltbare Pulver gewonnen (H. **39,** 484; 1903 und **44,** 500; 1905) und zwar:

a) ein wasserlösliches,

b) ein in Neutralsalzen lösliches, und

c) ein in Wasser und Alkohol lösliches (Peroxydase).

Alle drei Enzyme sind stickstoffhaltig und geben die Eiweissreaktionen. In ihren Aschen fand sich Eisen, Mangan, Phosphorsäure; kein Kupfer. Für das zweite Enzym ergab sich im Mittel folgende Zusammensetzung: 52% C, 7,5% H, 15% N.

Die Enzyme a und b bläuen Guajaktinktur direkt, c nur in Gegenwart von H_2O_2. Röhmann-Spitzers Reagens wird von a, b und c auch ohne H_2O_2 gefärbt. Ob diese Oxydase- bezw. Peroxydase-Reaktionen zu der Fähigkeit den Zucker zu verbrennen, in irgend einer Beziehung stehen, ist zweifelhaft. Jedenfalls sind die wesentlichen Bestandteile der von Frau Sieber gewonnenen Enzymkomplexe Gärungsenzyme, nicht Oxydationsenzyme.

Auch das glykolytische Enzym, welches Cohnheim (H. **39,** 396; 1903 und **42,** 401; 1904) im Muskel gefunden hat, woraus es im inaktiven Zustand gewonnen wird, ist seiner Natur nach eine Zymase. Es ist, wie die Hefezymase, ein ausgesprochenes Endoenzym und wird aus dem gefrorenen und zerkleinerten Muskel durch Auspressen oder durch Extraktion mit eiskalter isotonischer Natriumoxalatlösung gewonnen; die Oxalsäure muss hierauf durch die berechnete Menge $CaCl_2$ ausgefällt werden (H. **47,** 253; 1906). Zu diesem Enzym existiert ein Ko-Enzym oder Aktivator, welcher, wie derjenige der Hefezymase, hitzebeständig ist. Er wurde von Cohnheim aus dem Pankreasgewebe der Katze gewonnen.

Die Einwände, welche Claus und Embden gegen Cohnheims Versuche gemacht haben (Hofm. Beitr. **6**) sind von Cohnheim widerlegt worden.

Schliesslich seien noch die Versuche von Stoklasa (Chem. Ber. **38**, 664; 1905 und Arch. f. Hyg. **50**, 165, 1904) erwähnt, welche ebenfalls auf eine Zymase in den Muskeln und auch in der Milch hindeuten.

Dass die intramolekulare Atmung der Pflanzen als eine Zymasegärung anzusehen ist, wurde bereits erwähnt. (Palladin und Kostytschew H. **48**; Kostytschew Bot. Ber. **26**.) Auch Stoklasa hat die Enzyme der intramolekularen Atmung aus Keimlingen von Hordeum distichum, Pisum sativum und Lupinus luteus zu deutlicher Wirkung bringen können (Stoklasa, Ernest und Chočensky, H. **50**, 303; 1907 und **51**, 156; 1907). Die Einwände, welche gegen frühere Versuche Stoklasas ausgesprochen worden sind, können gegen die oben zitierten Arbeiten wohl nicht mehr geltend gemacht werden.

Palladin (Bot. Ber. **23**, 240; 1905) ist der Ansicht, dass die Atmungskohlensäure der Pflanzen in dreierlei Weise entsteht: 1. Durch die mit dem Protoplasma verbundenen Enzyme; Palladin nennt diesen Teil Nukleokohlensäure, und die derselben zugrunde liegenden Enzyme bezeichnet er als „Carbonasen". 2. Durch das Protoplasma selbst (wie es scheint unmittelbar) unter der Wirkung verschiedener Reize — Reizkohlensäure. 3. Durch Oxydasen. Verf. hat an anderer Stelle (Zeitschr. physik. Chem. **69** Arrhenius-Festschr.) betont, dass er den Ansichten Palladins nicht ganz beizustimmen vermag, besonders was die Carbonase und was die Rolle der Oxydasen und Reduktasen beim Atmungsprozess betrifft. Indessen soll nicht versäumt werden, auf die vielen bemerkenswerten Tatsachen, welche Palladin in den Berichten d. d. botan. Gesellschaft mitgeteilt hat, auch hier die Aufmerksamkeit zu lenken.

Darstellung von Hefepresssaft. 1 kg gewaschene, gut abgepresste Unterhefe wird mit 1 kg feinem Sand und 300 g Kieselguhr vermischt, und in 4—6 Portionen in einer grossen Reibschale verrieben, bis die Masse weich und klebrig geworden ist. Hierbei wird ein grosser Teil der Hefezellen zertrümmert. Der Teig wird nun in ein Segeltuch gelegt und in einer hydraulischen Presse abgepresst, wobei man den Druck bis auf etwa 90 kg pro Quadratzentimeter steigen lässt, und denselben dann etwa 1 Stunde konstant hält. Die Ausbeute beträgt etwa 400 ccm eines klaren, dickflüssigen, hellbraunen Saftes, welcher nur eine sehr geringe Anzahl lebender Zellen enthält. (Eduard und Hans Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1903, S. 58.)

Aus dem Hefepresssaft lässt sich dann die Zymase mit Alkohol oder Aceton fällen, wobei allerdings gleichzeitig eine grosse Menge von Eiweisskörpern, Kohlehydraten und Salzen niedergeschlagen wird. Um stark gärkräftige Präparate zu erzielen, muss man den Presssaft in einen grossen Überschuss von Aceton (10 Raumteile) eintragen; nur dann fallen die Niederschläge so wasserarm, dass chemische Vorgänge in denselben auf ein sehr

geringes Maass herabgedrückt werden (Buchner und Duchaček, Biochem. Z. **15**, 221; 1908).

Während eine Scheidung der bei den einzelnen Phasen der Alkoholgärung beteiligten Enzyme noch nicht gelungen ist, hat sich das Gärungsenzym bezw. der Komplex der Gärungsenzyme von dem Ko-Enzym trennen lassen.

Harden und Young (Proc. Roy. Soc. **77**, 408; 1906) pressen den Hefesaft mit 50 Atmosphären Druck durch ein Martinsches Gelatinefilter (eine mit Gelatinelösung imprägnierte Chamberlandkerze); die Zymase wird zurückgehalten, während das Ko-Enzym durch das Filter passiert. Einfacher ist die Methode von Buchner und Antoni, nach welcher man den Presssaft bei 0° durch Pergamentschläuche gegen Wasser dialysiert. Das Ko-Enzym, welches durch das Pergament geht, kann dann durch Eindunsten des äusseren Wassers gewonnen werden. Durch Vereinigung von Ko-Enzym und Zymase, welche getrennt keine Gärung hervorrufen können, wird eine gärkräftige Lösung erzeugt. Das Ko-Enzym enthält Phosphorsäure; auf die vermutliche Rolle derselben bei der Gärung kommen wir im Kap. IV zurück.

Darstellung von Dauerhefe. Ausser der oben beschriebenen Methode kennt man noch eine andere, welche es ermöglicht, die Gärwirkung der Hefezellen von den eigentlichen Lebensfunktionen zu trennen. Durch Eintragen von Hefe in Alkohol oder Aceton (Albert, Chem. Ber. **33**) tötet man die Zellen, ohne ihre Gärkraft zu zerstören. Gut abgepresste Hefe (500 g) wird gut zerkleinert auf ein Haarsieb gebracht und das Ganze in eine Schale mit 3 l Aceton eingetaucht. Durch Heben und Senken des Siebes in der Flüssigkeit unter Nachhilfe mit einem Bürstchen werden die Hefezellen in 3—4 Minuten durch die engen Maschen geschwemmt. Die Hefe bleibt nach dem Eintragen unter häufigem Umrühren noch 10 Minuten im Aceton liegen. Die Flüssigkeit wird grösstenteils abgegossen und die Hefe möglichst trocken abgesaugt. Der Filterrückstand wird aufs neue mit Aceton übergossen und verrieben, wieder abgesaugt und mit 250 ccm Äther durchknetet. Nach Absaugen wird die Hefe an der Luft getrocknet, fein zerrieben und während 24 St. im Trockenschrank bei 45° getrocknet.

Das Präparat ist übrigens unter dem Namen „Zymin“ bei A. Schroder, München, im Handel zu beziehen.

Die besten Antiseptika bei Versuchen mit Hefepresssaft sind Toluol und Thymol.

Milchsäurebakterien-Zymase.

Es ist dies das Enzym, welches die Milchsäurebakterien befähigt, Zucker in Milchsäure zu zerlegen. Die enzymatische Natur dieses Vorganges wurde von Buchner und Meisenheimer (Chem. Ber. **36**, 635; 1903 und Lieb. Ann. **349**, 125; 1906) bewiesen; es gelang ihnen, ein aktives Dauerpräparat

des Bacillus Delbrückii herzustellen, welches zur Bildung von allerdings nur kleinen Mengen dl-Milchsäure Veranlassung gab.

Darstellung: Die Heranziehung der Kultur geschah auf Malzroggenmaische bei 40—45°.

Nach der Entwicklung wurden die Bakterien abzentrifugiert und auf Ton getrocknet. Die Bakterienmasse wird dann in das 15—20fache Gewicht Aceton eingetragen, mit einem Pistill unter dem Aceton während 10—15 Minuten fein zerrieben, abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Oxydasen.

Die Reaktionen, bei welchen man die Mitwirkung von Oxydasen angenommen hat, sind von sehr verschiedener Art. Es sind die Oxydationen von Fett und Kohlehydraten, der Übergang von Alkoholen und Aldehyden in Säuren und schliesslich die Überführung einfacher und substituierter Phenole, Amine, Aminosäuren und Abkömlinge dieser Stoffe in Chinonderivate.

Zum Nachweis von Oxydasen hat man sich einer Menge von Reaktionen bedient, unter welchen die folgenden angeführt seien; sie werden übrigens bei weitem nicht von allen Oxydasen hervorgerufen; vielmehr wirken die Oxydasen ziemlich weitgehend spezifisch.

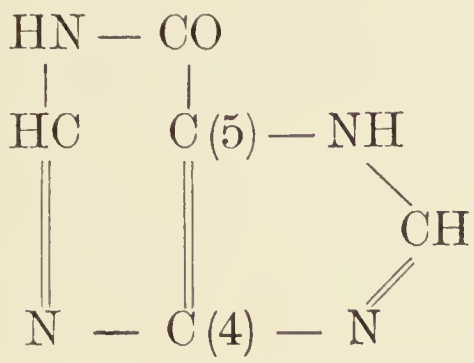
Blaufärbung von Guajaktinktur bezw. von α-Guajakonsäure, Violettfärbung von Tetramethylparaphenylendiamin; Braunfärbung von m- und p-Phenylendiamin für sich und in Gegenwart von H_2O_2 (Aso); Rotfärbung von Anilinacetat und Blaufärbung von α-Naphtol (Bourquelot, C. r. **123**; Soc. Biol. **46**), Rotfärbung von Aloïn (Schaer, Arch. d. Pharm. **238**; Kastle); Oxydation von Phenolphtalin zu Phenolphtaleïn (Kastle und Shedd, Amer. Chem. J. **26**), Oxydation von Benzidin; Leukorosolsäure (Kastle, Chem. Zbl. **77**, 1554, 1906), Hydrochinon, Pyrogallol und Guajakol; Oxydation des Leukomalachitgrüns zu Malachitgrün (spektrophotometrische, quantitative Methode von Czyhlarz und v. Fürth); Oxydation von Aldehyden, wie Salicylaldehyd (Schmiedeberg, Arch. f. exper. Path. **14**), Formaldehyd (Pohl, Arch. f. exper. Path. **38**), von arseniger Säure zu Arsensäure, ferner die Bildung von Diaminophenacin aus o-Phenylendiamin, sowie von Indophenol aus p-Phenylendiamin und α-Naphtol (Röhmann und Spitzer, Chem. Ber. **28**, 567; 1895).

Auch die Ausscheidung von Jod aus Jodkalium ist als Oxydasereaktion angesehen worden. Indessen dürfte, wie Aso und neuerdings Wolff und de Stöcklin (C. r. **146**) betonen, diese Wirkung der in Pflanzensäften vorkommenden salpetrigen Säure zuzuschreiben sein.

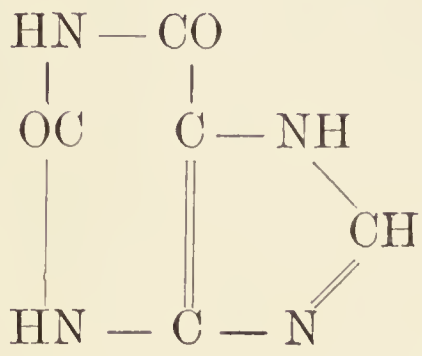
Vorkommen: Viele tierische Extrakte und Säfte haben die Fähigkeit, eine Anzahl der oben angegebenen Reaktionen hervorzurufen, besonders wird Benzaldehyd oder Salicylaldehyd von zahlreichen tierischen Organextrakten oxydiert. Ob es sich dabei um ein Enzym, eine Salicylase handelt, ist allerdings zweifelhaft.

Unter den oxydierenden Enzymen der Purinbasen ist die Wirkung der Xanthinoxydase, besonders durch die Arbeiten von Burian, am besten gekannt. Das Ferment greift die durch gewöhnliche Oxydationsmittel so leicht zerstörbare Harnsäure nicht an. Burian vermutet dass

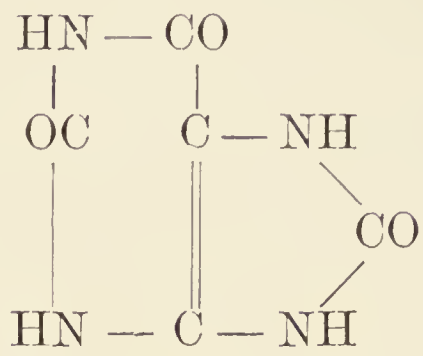
diese Oxydase ein ganz allgemein auf (cyklische?) Amidine abgestimmtes Oxydationsferment sei, welches die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 des Purinkerns nicht anzugreifen vermag.



Hypoxanthin



Xanthin



Harnsäure

Ein harnsäureoxydierendes Enzym, welches in Allantoin überführt, haben Wiechnowski und H. Wiener (Hofm. Beitr. **9**, 247 und 295; 1907) aus tierischen Organen durch Behandlung der gemahlenen Organpulver (der vollständig zertrümmerten Zellen) mit 0,05% Sodalösung gewonnen.

Die unmittelbar nach dem Vermahlen mit Sodalösung erhaltenen Filtrate sind unwirksam. Unterwirft man die Emulsion einer 5—6tägigen Dialyse gegen 0,05%ige Sodalösung, so geht das Ferment der Hundeleber vollständig, dasjenige aus der Rinderniere zum Teil ins Filtrat über. Auch durch Zentrifugieren der Emulsion gewannen die Verfasser fermenthaltige Zentrifugate. Durch wiederholtes Fällen und Filtrieren gelangt man zu einem eiweissfreien Präparat, welches die gesamte fermentative Wirkung des Ausgangsmateriales enthält.

Von den pflanzlichen Oxydasen ist in erster Linie die Laccase aus dem Lackbaum zu erwähnen, welche von Yoshida gefunden und von Bertrand eingehend studiert wurde. Bertrand gibt folgende Vorschrift zur Darstellung (Ann. de Chim. et de Phys. [7] **12**; 1907):

Den dicken Saft von Rhus succedanea mischt man mit dem 5—6fachen Volumen Alkohol; die im Alkohol unlösliche Laccase wird dadurch ausgefällt, während die Phenolderivate, welche die Schwarzfärbung des Lackes bewirken, in die alkoholische Lösung gehen. Man filtriert durch ein Tuch, und wäscht den Rückstand auf demselben mehrfach mit Alkohol. Er wird mit kaltem destillierten Wasser aufgenommen, wobei nur eine geringe Menge schwarzer Substanzen hinterbleibt. Die abfiltrierte Lösung wird nun nochmals durch einen grossen Alkoholüberschuss gefällt; der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und im Vakuum getrocknet.

Man erhält die Laccase als eine weisse, in Wasser leicht lösliche Substanz von neutraler Reaktion. Bertrand hält sie für einen Eiweisskörper, obwohl sein Präparat nur 0,44% Stickstoff enthielt. Er nimmt die Zusammensetzung folgendermassen an:

Feuchtigkeit (bestimmt bei + 120°) . .	7,40%
Gummi (Arabane und Galaktane) . . .	84,95%

Laccase	2,50 %
Asche	5,17 %

Der wesentlichste Bestandteil der Asche ist Mangan. Der Gehalt der Asche an diesem Metall betrug 2,5 %.

Die Laccase ist ausserordentlich säureempfindlich (vgl. Kap. III), und wird schon durch kurzes Kochen der Lösung zerstört.

Auch aus anderen Pflanzen, wie Medicago sativa und Lolium perenne, hat Bertrand Präparate gewonnen, welche er als Laccasen bezeichnet, da sie in neutraler Lösung in Gegenwart von Mangansalzen die Oxydation von Polyphenolen beschleunigen. Wie Verf. betont hat (H. **61**), sind sie von Rhus-Laccase recht verschieden.

Darstellung der Medicago-Laccase. Die frischen Pflanzen, welche sich im Beginn der Blüte befinden, werden zerkleinert, gehackt und abgepresst. Der Presssaft scheidet beim Stehen dunkle Flocken ab, von welchen er durch Filtrieren befreit wird. Man fällt hierauf mit Alkohol, saugt den reichlichen Niederschlag ab, bringt den grössten Teil wieder mit Wasser in Lösung und fällt nochmals. Diese Umfällung wird dreimal wiederholt. Das so erhaltene Präparat ist nach dem Trocknen im Exsikkator ein staubfeines, weisses, in Wasser sehr leicht lösliches und sehr hygroskopisches Pulver. Es besteht nach Euler und Bolin im wesentlichen aus den Calciumsalzen von aliphatischen Oxysäuren. Die Aufteilung des Gemisches geschieht durch fraktionierte Krystallisation der entsprechenden Baryumsalze; man findet Glykolsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure und Mesoxalsäure. Die Oxydationswirkung dieser Salze ist im Kap. IV angegeben.

Es ist vielfach versucht worden, die Laccasen künstlich darzustellen. Nach Bertrand setzt sich das oxydierende Agens vieler Pflanzen aus Mangan und einem spezifisch wirkenden Eiweisskörper zusammen. Trillat (C. r. **138**, 94 und 274; 1904) hat nun vermutet, dass die als ein spezifisches Enzym angesehene Laccase auch durch beliebige Eiweisskörper oder wenigstens durch gewisse Klassen derselben ersetzt werden könne. Indessen hat Trillat für seine Vermutung keine festen Anhaltspunkte gefunden.

Auch die Versuche von Dony-Hénault, die Wirkung der Laccase auf die Alkalinität der Präparate zurückzuführen und also die Laccasewirkung nur als eine Oxydation durch Mangan und Hydroxylionen zu deuten, hält Verf. besonders auf Grund eigener Versuche mit Rhus-Laccase für missglückt. Die nach Bertrands Vorschrift gewonnenen Laccase-Präparate sind nicht alkalisch und ausserordentlich wirksam.

Weitere Versuche zur Darstellung von künstlichen Oxydasen und Peroxydasen haben angestellt: Martinaud (C. r. **148**), Wolff (C. r. **147**) und de Stoecklin (C. r. **147**).

Bei anderen Oxydasen ist die Reinigung und Isolierung so wenig gelungen, dass nicht einmal festgestellt ist, zu welcher Körperklasse diese Stoffe gehören.

Slowtzoff (H. **31**) hat versucht, die in Kartoffeln enthaltene „Laccase" rein darzustellen. Sein reinstes Präparat enthielt 12,8 % N und 0,53 % S.

Ganz andere Zahlen erhielt Sarthou (Journ. Pharm. Chim. [6] **13**) für seine Schinoxydase, nämlich 6,28 % N und 0,2 % S, sowie 1,34 % Asche, und schloss hieraus auf ein Nukleoproteid. Aso und Loew halten die Oxydasen

für Albumosen. Dagegen scheint aus Rosenfelds Untersuchung über die Oxydase aus Rettichwurzel (Raphanus sativus L.) (Dissertation, Petersburg 1906) hervorzugehen, dass dieses Enzym nicht zu den Eiweisssubstanzen gehört. Nach Rosenfeld wäre die Oxydase eine krystallinische Substanz, enthielte C, N, S, P und K, dagegen weder Fe noch Mg.

Während Spitzer zum Resultat gekommen war, dass die Leberoxydase ein Nukleoproteid ist, wurde dieses Enzym, welches Salicylaldehyd zu Salicylsäure oxydiert, durch Jacoby weiter gereinigt (H. **30**). Es ist eine in Wasser lösliche Substanz, die durch Erhitzen unwirksam wird, nicht diffusibel ist, und die für Eiweisskörper charakteristischen Reaktionen nicht gibt.

Nach Tschirch und Stevens (Arch. d. Pharm. **43**) zeigt die Oxydase des japanischen Lackes die Pyrrolreaktion. Nun besteht nach Bach und Chodat die Oxydase aus einer Peroxydase und einer Oxygenase, von welchen auch die Peroxydase allein die Pyrrolreaktion geben soll (Bach, Chem. Ber. **41**, 226; 1908).

Önoxydase in Äpfeln (Lindet, C. r. **120**), Birnen, Pflaumen, Trauben und dem auf Trauben parasitierenden Pilz Botrytis cinerea dürfte eine Tanninoxydase sein; unter ihrer Mitwirkung bräunt sich das Fruchtfleisch der genannten Pflanzen an der Luft.

Oxydasen zweifelhafter Individualität sind bei zahlreichen Pflanzenformen nachgewiesen, so bei Arum maculatum, in Oliven („Olease"), Gerste und Malz („Spermase"), in Kaffeebohnen und in Hefe.

Falls sich die Beobachtung von Batelli (C. r. **138**) über die Oxydation von Ameisensäure zu Kohlensäure durch Oxydasen unter Mitwirkung von H_2O_2 bestätigt, so liegt hier eine interessante organische Oxydation vor.

Peroxydasen.

Unter diesem Namen fasst man bekanntlich diejenigen Stoffe zusammen, welche Peroxyde aktivieren. Ihre typische Reaktion ist die Übertragung des Sauerstoffs von Wasserstoffperoxyd auf Guajakonsäure oder auf Polyphenole.

Für die Darstellung von Peroxydase aus Kürbisfrüchten und Meerrettichwurzeln besitzen wir eine Vorschrift von Bach und Chodat (Chem. Ber. **36**, 600; 1903). Bach und Tscherniak haben neuerdings eine Peroxydase folgendermassen dargestellt (Chem. Ber. **41**).

30 kg weisse Rüben werden zerkleinert, abgepresst und der erhaltene Saft — 20 l — zum Koagulieren der schleimigen Stoffe mit 2 l 96%igem Alkohol versetzt. Nach Filtrieren wurde der alkoholhaltige Saft mit 130 l starkem Alkohol gefällt, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuum vom Fällungsmittel befreit. Die so erhaltene Rohperoxydase — 52 g — wurde mit 600 ccm Wasser verrieben, wobei nur ein geringer Teil der Substanz in Lösung ging. Das Ungelöste

wurde abfiltriert, mit wenig Wasser nachgewaschen, und von dem Filtrat werden 600 ccm, welche nur ca. 7 g Trockensubstanz enthielten, mit 40 g gepulvertem basischem Bleiacetat versetzt; der Niederschlag wurde abgesaugt und das klare Filtrat — 600 ccm — wurde bis zum Ausbleiben jeder Trübung mit gepulvertem Natriumkarbonat (21 g) behandelt. Das alkalische Filtrat wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, und zwar durch echtes Pergament. Nach 13 Tagen wurde die Dialyse abgebrochen. Das Dialysat (670 ccm) wurde mit 4,5 l 99%igem Alkohol versetzt, der entstandene Niederschlag wurde nach 24 Stunden auf einem gehärteten Filter gesammelt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und im Vakuum vom Alkohol befreit.

Dieses Präparat enthielt 7,87% Wasser, 81,66% organische Stoffe und 1,47% Asche. Die Stickstoffbestimmung, auf aschefreie Substanz bezogen, ergab 3,44% N.

Die von E. de Stöcklin im Chodatschen Laboratorium aus Cochlearia armoracia dargestellte Peroxydase enthielt 11,41% Wasser, 65,88% organische Stoffe, 22,71% Asche. Der Stickstoffgehalt war 3,43%. Das Aktivierungsvermögen dieser Peroxydase betrug etwa 1/10 von demjenigen des oben erwähnten Bachschen Präparates. Weder Stöcklin noch Chodat (Schweiz. Woch. Chem. u. Pharm. **43**; 1905) haben mit ihren Peroxydasen Eiweissreaktionen erhalten.

Nach den Erfahrungen des Verf. (H. **61**) ist Dialyse die zurzeit beste Reinigungsmethode für Peroxydasepräparate. Euler und Bolin kamen zu einem Präparat aus Meerrettich, welches sich um so wirksamer erwies, je länger die Dialyse getrieben wurde. Das pro Gewichtseinheit wirksamste Präparat, welches wir bis jetzt erhalten haben, enthielt 10,4% N und 2,5% Asche. Noch viel wirksamer ist die Dialyse, wenn man den enzymhaltigen Saft vorher mit Kaolin oder einem anderen geeigneten Adsorptionsmittel enteiweisst. Deleano (Biochem. Z. **19**) schlägt hierzu kolloides Eisenhydrat vor.

Schliesslich ist noch die Oxydase der Essigbakterien zu erwähnen. Sie oxydiert Äthylalkohol zu Essigsäure und katalysiert also eine Reaktion, zu welchen sonst energische Oxydationsmittel erforderlich sind. Das Enzym von den Bakterien zu trennen, ist bisher nicht gelungen, dagegen kann man seine Existenz durch Töten der Bakterien mit Aceton nachweisen (Buchner und Meisenheimer, Chem. Ber. **36**, 637; 1903. — Buchner und Gaunt, Lieb. Ann. **349**).

Darstellung. Grössere Mengen von Essigbakterien (am besten Bacterium aceti, welches man jederzeit durch Stehenlassen von Bier an der Luft in einer Glasschale gewinnen kann) züchtet man auf mit 4% Alkohol und 1% Essigsäure versetzter Bierwürze. Als Zuchtgefässe eignen sich möglichst grosse, flache Glasschalen, welche durch Überdecken mit einer Lage Watte gegen das Hereinfallen von Keimen aus der Luft einigermassen geschützt sind. Die Bakterien bilden binnen vier bis fünf Tagen nach der

Impfung eine ziemlich kräftige Decke auf der Nährlösung. Nach dieser Zeit hebert man die untere klare Flüssigkeitsschicht ab; der Rest wird zentrifugiert, und die so von der Hauptmenge Flüssigkeit befreiten brüchigen Bakterienhäute werden nach einmaligem Auswaschen mit Wasser oberflächlich auf Ton getrocknet. Am anderen Tage trägt man die Masse in das 10 bis 20fache Gewicht Aceton ein, verreibt sie zu einem feinen Pulver, filtiert nach zehn Minuten ab, wäscht mit Äther und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure. Man erhält dann ein gelbliches Pulver, welches allerdings nur recht geringe Mengen Äthylalkohol oxydiert.

Tyrosinase.

(G. Bertrand, Bull. Soc. Chim. de Paris [3] **15**, 791; 1896.) Aus Tyrosin und Tyrosinderivaten bildet dieses Enzym durch Oxydation Melanine, dunkelgefärbte Stoffe von noch unbekannter chemischer Zusammensetzung.

Interessante chemische Anhaltspunkte über die Tyrosinasewirkung haben vor kurzer Zeit Abderhalden und Guggenheim (H. **54**) gewonnen. Sie konnten zeigen, dass Ozon und Tyrosin für sich noch keine Melanine bilden; dass aber solche aus Tyrosin bezw. tyrosinhaltigen Polypeptiden einerseits und Phenolen oder Aminosäuren andererseits unter Oxydation synthetisiert werden. Ganz ähnliche Färbungen erhält man, wenn man statt mit Tyrosinase mit Kaliumbichromat oxydiert, und es ist somit wahrscheinlich, dass die Tyrosinase ein Oxydationsmittel enthält, welches seine Wirkung gemeinsam mit den Aminosäuren des Pflanzensaftes ausübt.

Von der Tyrosinase wird nicht nur l-Tyrosin selbst angegriffen, sondern auch dl-Tyrosin, Tyrosinanhydrid (Bertrand und Rosenblatt; Chodat) und eine grosse Anzahl von tyrosinhaltigen Polypeptiden. Auch Suprarenin (= Adrenalin) wird oxydiert, ferner alle Kresole, Resorcin, m-Toluidin, o-, m- und p-Xylenol, Thymol, Carvacrol und Naphtol. Nach Bertrand auch Phenol.

Die von Gonnermann ausgesprochene Meinung, dass die spezifische Wirkung der Tyrosinase in einer Hydrolyse besteht, welcher dann eine (nicht spezifische) Oxydation folgt, hat von seiten Chodats und Bachs Widerspruch erfahren.

Die Darstellung geschieht durch Extraktion der zerkleinerten Pilze mit Wasser und Fällen der Extrakte mit Alkohol.

Vorkommen. In zahlreichen Hutpilzen der Gattungen Boletus, Russula, Lactarius, Coprinus, Paxillus usw. Ferner in Merulius lacrymans, im Rübensaft, in Dahlia-Knollen, Kartoffelschalen und Vicia faba. Vielfach soll die Tyrosinase von Laccasen begleitet werden.

Ein Tyrosinase-ähnliches Enzym, welches auf Adrenalin wirkt, hat C Neuberg aus Sepia gewonnen.

Katalasen.

(O. Loew, Rep. U. S.-Dep. of Agric. Nr. 68; 1901.) Nachdem die Tätigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, lange als eine allgemeine Eigenschaft der Enzyme betrachtet worden war, wies O. Loew die Existenz besonderer Katalasen nach. Der Entdecker unterscheidet zwei in Pflanzen vorkommende Katalasen, eine mit Wasser nicht extrahierbare α-Katalase, welche ein Nukleoproteid, und eine wasserlösliche β-Katalase, welche eine Albumose sein soll.

Die chemische Wirkung der Katalasen ist analog derjenigen der kolloiden Metalle (Bredig); so entsteht also neben Wasser molekularer (inerter) Sauerstoff. Äthylhydroperoxyd wird nicht zerlegt (Bach und Chodat, Chem. Ber. **36**, 1757; 1903).

Vorkommen: Höchst verbreitet im Tier- und Pflanzenreich. Kommt im Blut vor (Senter, Lesser, Z. Biol. **48** u. a.), in zahlreichen Organen (Kastle und Loevenhart, Liebermann, Batelli, C. r. **138**, 923; 1904), in Milch (Raudnitz, Z. Biol. **42**. — Reiss, Z. klin. Med. **56**. — Faitelowitz, Diss. Heidelberg 1904). Ferner findet man Katalase in so gut wie allen Pflanzensäften; besonders reich an Katalase sind viele Blätter, z. B. von Klee, Rosa, Picea, welche hauptsächlich die unlösliche Form des Enzyms enthalten, ferner gewisse Samen, z. B. der Äpfel und Pfirsiche, in welchen hauptsächlich die lösliche Katalase enthalten ist. Sehr kräftige Katalasen erhält man aus Hutpilzen, z. B. Boletus scaber (Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kem. **1**) und aus niederen Pilzen, aus Hefen und Bakterien.

Die Darstellung geschieht allgemein durch Fällen der wässrigen Extrakte mit Alkohol. Für die Gewinnung der Blutkatalase gibt Senter folgende Vorschrift: Defibriniertes Ochsenblut bleibt mit dem zehnfachen Volumen kohlensauren Wassers über Nacht stehen. Dann wird zentrifugiert und filtriert, die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt, die Hämoglobin-Alkohollösung abgegossen und der rotbraune Niederschlag noch wiederholt mit 50%igem Alkohol gewaschen. Die im Vakuum getrocknete Fällung verreibt man zu einem feinen Pulver, rührt sie mit Wasser an, und lässt zwei bis drei Tage im Eis stehen, um das Enzym vollkommen zu extrahieren. Die Lösung wird so oft durch gehärtetes Filtrierpapier filtriert, bis sie ganz klar ist; die schwach gelbliche Flüssigkeit zerlegt zugesetztes Hydroperoxyd kräftig unter Entwickelung von Sauerstoff.

Will man sehr reine Katalaseprodukte darstellen, so eignet sich Rinder- oder Schweinefett als Ausgangsmaterial am besten. Man extrahiert es nach Verteilung durch Sand mit Wasser bei etwa 30°, fällt mit Alkohol und reinigt weiter durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol (Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kem. **1**, 357; 1904. — Bach, Chem. Ber. **38**, 1878; 1905).

Verf. hat bei seinen ersten Versuchen (l. c.) ein Präparat erhalten, welches noch schwache Eiweissreaktionen zeigte und 14,5% N, 1,2% S, aber keinen Phosphor enthielt. Ein analog gereinigtes Präparat aus defibriniertem Blut ergab 14,1% N. Eine (noch nicht veröffentlichte) Fortsetzung dieser

Untersuchung hat jedoch zu sicher reineren Enzympräparaten geführt. Der Stickstoffgehalt nahm mit fortschreitender Reinigung ab, das letzte stark aktive Präparat enthielt 6,2% N. Millons und Molischs Reaktionen fielen positiv aus. Fettkatalase scheint hiernach kein Eiweisskörper zu sein. Doch sollen die gegenteiligen Resultate von Bach (l. c.) nicht unerwähnt bleiben. Die Frage, ob Katalase ein Eiweisskörper ist oder nicht, bedarf also der weiteren Untersuchung.

Reduzierende Enzyme.

Von de Rey-Pailhade ist ein Stoff „Philothion" beschrieben worden, welcher von ihm und von Pozzi-Escot als reduzierendes Enzym aufgefasst wird. Dieser Darstellung kann der Verf. nicht zustimmen. Die von de Rey-Pailhade und Pozzi-Escot beschriebenen Reaktionen sind nicht enzymatischer Natur. Überhaupt sind reduzierende Enzyme bisher nicht mit voller Sicherheit nachgewiesen worden. In den meisten Fällen, in welchen man Reduktion beobachtet hat, ist es nicht einmal versucht worden zu zeigen, dass es sich wirklich um eine Enzymwirkung, also eine katalytische Reaktion, und nicht einfach um die stöchiometrische Reduktion durch einen leicht oxydablen Körper handelt.

Eine Substanz, welche bei 70° die Reduktion von Methylenblau durch Formaldehyd beschleunigt, existiert in der Milch (Schardinger). Dass es sich hier um eine katalytische Wirkung handelt, wurde durch die Arbeiten von S. Oppenheimer (Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie in Frankfurt **4**, 1908) und von Trommsdorff (Zentr. f. Bakt. **49**, 291; 1909) wahrscheinlich gemacht. Die Schardingersche Reaktion wird übrigens auch durch kolloides Platin und Iridium beschleunigt (Bredig und Sommer, Z. physik. Chem. **70**).

Abelous und seine Mitarbeiter haben bei den Arbeiten mit Pferdenieren Bakterienwirkungen nicht ausgeschlossen. Tatsächlich bleibt jede Reduktion aus, wenn der Extrakt durch eine Chamberlandkerze filtriert wird, wie dies Abelous selbst angibt und Verf. bestätigen konnte. Vergl. hierzu auch die Arbeiten von Heffter (Schmiedeberg-Festschrift 1908). In reduzierenden niederen Pflanzenorganismen ist allerdings das Vorkommen von Reduktasen in hohem Grade wahrscheinlich. Eine lesenswerte Studie über die Reduktionswirkung von Pflanzensäften verdankt man Kastle und Elvove (Amer. Chem. J. **31**).

Anhang.

In der vorstehenden Übersicht sind nur solche Enzyme erwähnt, über deren Wirkungsart und Individualität wir einigermassen orientiert sind. Eine grosse Anzahl von Enzymen, welche besondere Namen erhalten haben, ist

hier nicht aufgenommen worden, da diese Stoffe sich nur unwesentlich von den bekannteren Repräsentanten der gleichen Gruppe unterscheiden.

Einige andere Enzyme, welche in den Hauptgruppen der Enzyme keinen Platz gefunden haben, sollen hier wenigstens kurz erwähnt werden, da ihr näheres Studium nicht ohne Interesse zu sein scheint.

1. Ein isomerisierendes Enzym, welches Mannose in Glukose umwandeln soll, glaubt Gatin (Soc. Biol. **64**) in Samen von Borassus flabelliformis gefunden zu haben.

2. Kotake (H. **57**) berichtet über ein Enzym der Rinderleber, welches imstande ist, Coffein zu entmethylieren, so dass Xanthin, Hypoxanthin, 1-Methylxanthin usw. entstehen.

3. In der Niere und der Leber fanden Gottlieb und Stangassinger (H. **52** u. **55**) Stoffe vermutlich enzymatischer Natur, welche Kreatin in Kreatinin verwandeln.

Kap. II.

Physikalische Eigenschaften der Enzyme.

Wenn sich auch der Verlauf der meisten enzymatischen Reaktionen durch Formeln darstellen lässt, welche für Katalysen in homogenen Systemen gelten, und wenn also auch die Dynamik bis jetzt wenig Anhaltspunkte für den Lösungszustand bezw. die kolloide Beschaffenheit der Enzyme bietet, so machen sich Adsorptionserscheinungen beim Arbeiten mit enzymhaltigen Flüssigkeiten stets mehr oder weniger stark geltend und sind für das allgemeine chemische Verhalten der Enzyme wesentlich mitbestimmend.

Wo immer eine Flüssigkeit an den Dampfraum grenzt, bildet sie an der Oberfläche eine Schicht aus, welche andere Eigenschaften besitzt als die im Inneren befindliche Flüssigkeit; man bezeichnet sie als Oberflächenschicht. Dieselbe hat das Bestreben, sich zu verkleinern, und verursacht hierdurch die bekannten Kapillarerscheinungen; auf das Innere der Flüssigkeit übt sie einen Druck aus, welchen man als Binnendruck bezeichnet.

Die Dicke dieser Oberflächenschicht, welche sich von der übrigen Flüssigkeit unterscheidet, ist sehr gering.

Auch der Druck, womit die Oberflächenschicht die innere Flüssigkeit zusammenpresst, ist sehr klein, wenn nicht das Verhältnis zwischen der Oberfläche eines Stoffes und seinem Volumen, die „spezifische Oberfläche“ sehr gross, also die Verteilung des Stoffes eine sehr weitgehende ist. Letzteres ist bekanntlich besonders bei den sogen. kolloiden Lösungen der Fall.

Wir beginnen mit einem kurzen theoretischen Überblick über die Oberflächenerscheinungen, und folgen einer von Maxwell gegebenen Darstellung.

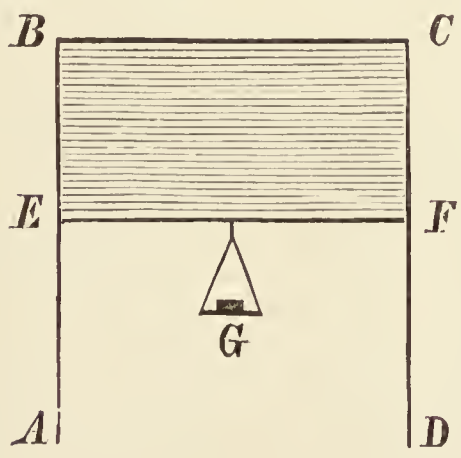


Fig. 1.

An dem rechtwinkelig gebogenen Draht ABCD (Fig. 1) sei das Drahtstück EF frei verschiebbar. Innerhalb des Rahmens EBCF befinde sich eine Flüssigkeitslamelle, welche sich infolge der Oberflächenspannung zu verkleinern, also die Seite EF aufwärts zu ziehen strebt. Das Gewicht sei so gewählt, dass es den Zug der Lamelle auf den Draht gerade kompensiert; eine Vergrösserung der Belastung G würde dann die Lamelle zerreissen, während eine Verkleinerung die Aufwärtsbewegung von EF zur Folge hätte.

Der Zug der Lamelle ist durch ihre Oberflächenspannung veranlasst, und zwar entspricht er, da die beiden Flächen der Lamellen wirksam sind, der doppelten Oberflächenspannung.

Verschiebt man nun mit dem Gewicht G den beweglichen Draht von seiner höchsten Lage an BC bis zur Lage EF, so hat man gegen die Oberflächenspannung eine Arbeit geleistet, welche proportional ist mit G (der Oberflächenspannung gleich gemacht) und mit der Grösse der erzeugten Oberfläche[1]). Diese Arbeit stellt offenbar die Oberflächenenergie dar, und es ist:

Oberflächenenergie = Oberflächenspannung × Oberfläche.

Die Oberflächenspannung lässt sich also ausdrücken durch die auf die Flächeneinheit wirkende Energie oder durch die auf die Streckeneinheit wirkende Kraft, und wird gewöhnlich angegeben in $\frac{\text{dyn}}{\text{cm.}}$

Bei dem geringen absoluten Betrag, welche die bekannten Oberflächenspannungen von Flüssigkeiten und wässerigen Lösungen besitzen — etwa 100 $\frac{\text{dyn}}{\text{cm,}}$ — erreicht die Oberflächenenergie einer Flüssigkeit erst erhebliche Werte, wenn die Oberfläche gross wird, und kommt also gegenüber den anderen Energieformen eines Stoffes erst in Betracht, wenn das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen, die „spezifische Oberfläche“ nach Wo. Ostwald, einen gewissen Betrag, etwa 10000 überschreitet.

Die physiologisch wichtigsten und interessantesten Erscheinungen dieses Gebietes betreffen nicht die reinen Flüssigkeiten, sondern teils Lösungen, teils „heterogene Systeme“ in welchen sich ein Stoff in feinster Verteilung befindet, die wir mit Wilh. Ostwald disperse Gebilde nennen können.

Lösungen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Konzentration an der Oberfläche einer Lösung verschieden ist von derjenigen, welche im Inneren der Lösung herrscht. Dies lässt sich experimentell zeigen und ist übrigens eine Forderung der Thermodynamik. Die folgende Herleitung schliesst sich der von Millner (Phil. Mag. (6) **13**, 96; 1907) gegebenen an, welche auch H. Freundlich in seiner „Kapillarchemie“ anführt.

In einem gewissen Volum v seien n Moleküle gelöst. Die Konzentration ist dann nicht gleichmässig $\frac{n}{v}$, sondern in der Oberflächenschicht bezw. im Innern grösser oder kleiner. Bezeichnet man den Überschuss pro Oberflächeneinheit ω mit σ, so ist der Konzentrationsüberschuss in der ganzen Oberfläche $\sigma\,\omega$, und die Konzentration im Innern ist $c = \frac{n - \sigma\,\omega}{v}$.

Durch die Betrachtung eines thermodynamischen Kreisprozesses gelangt man zur Differentialgleichung

$$\frac{d\,\tau}{d\,v} = -\frac{d\,p}{d\,\omega}, \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (I)$$

wo τ die Oberflächenspannung und p den osmotischen Druck bezeichnet.

---

[1]) Von der Dehnung der Oberfläche ist die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten unabhängig.

Dieselbe drückt aus, dass sich die Oberflächenspannung mit dem Volum, also auch mit der Konzentration ändert, wenn sich der osmotische Druck mit der Grösse der Oberfläche ändert, was nur eintreten kann, wenn die Konzentration in der Lösung von der Grösse der Oberfläche abhängt, also von der Konzentration in derselben verschieden ist.

Entwickelt man obige Gleichung (I) als Funktion von c, so erhält man:

$$\frac{d\,\tau}{d\,v} = \frac{d\,\tau}{d\,c} \cdot \frac{d\,c}{d\,v} = -\frac{c}{v}\frac{d\,\tau}{d\,c} \quad \ldots\ldots\ldots \text{(II)}$$

und

$$\frac{d\,p}{d\,\omega} = \frac{d\,p}{d\,c} \cdot \frac{d\,c}{d\,\omega} = -\frac{\sigma}{v}\frac{d\,p}{d\,c} \quad \ldots\ldots\ldots \text{(III)}$$

Der Konzentrationsüberschuss pro Oberflächeneinheit ist also gegeben durch:

$$\frac{d\tau}{dc} = -\frac{\sigma}{c}\frac{dp}{dc} \quad \ldots\ldots\ldots \text{(IV)}$$

Ist die Änderung der Oberflächenspannung mit der Konzentration bekannt, so kann also σ aus (IV) berechnet werden. Gehorcht der osmotische Druck den einfachen Gasgesetzen, so wird $\frac{dp}{dc} = RT$ und somit ist:

$$\frac{d\tau}{dc} = -RT\frac{\sigma}{c} \text{ oder } \sigma = -\frac{c}{RT}\frac{d\tau}{dc}$$

Soweit die Oberflächenspannung anorganischer Lösungen gemessen ist, zeigt sich ein lineares Ansteigen mit der Konzentration, d. h. $\frac{d\tau}{dc}$ ist positiv und konstant, und somit ist σ negativ und $\frac{\sigma}{c}$ ist konstant. Demnach gelangen wir zum Resultat:

Wenn die Oberflächenspannung einer Lösung mit steigender Konzentration abnimmt, so reichert sich der gelöste Stoff in der Oberfläche an; wenn umgekehrt die Oberflächenspannung einer Lösung mit steigender Konzentration zunimmt, so ist die Konzentration in der Oberfläche geringer als im Innern.

Der Satz kann auch so ausgedrückt werden:

Ein gelöster Stoff wird adsorbiert, wenn er die Oberflächenspannung erniedrigt; im entgegengesetzten Fall soll die Adsorption „negativ“ sein.

Zu den Stoffen, welche die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigen, gehören nun die meisten Verbindungen, welche keine starken Elektrolyte sind, also Alkohole, Glycerin, Fettsäuren usw. Ihrem Bestreben, sich an der Oberfläche der wässerigen Lösung anzusammeln, hält bei einer gewissen Oberflächenkonzentration das Gefälle des osmotischen Druckes das Gleichgewicht.

Im Gegensatz zu den genannten Stoffen erhöhen manche Salze die Oberflächenspannung des Wassers gegen Luft und vermutlich auch gegen andere Medien, und eine Adsorption von der gleichen Art wie die oben behandelte kann dann also nicht eintreten.

Es muss hier noch näher definiert werden, was unter der Oberflächenspannung einer Lösung zu verstehen ist. Da die Oberflächenspannung von der Konzentration abhängt, und da sich in jeder frisch gebildeten Oberfläche im Laufe der Zeit eine Konzentration herstellt, welche von derjenigen im Innern verschieden ist, so hat offenbar eine frisch gebildete Oberfläche, welche

mit dem Innern der Lösung noch nicht ins Konzentrationsgleichgewicht gekommen ist, eine andere Oberflächenspannung als eine bereits im stabilen Gleichgewicht befindliche. Man bezeichnet letzteren Wert passend als statische Oberflächenspannung, während ersterer dynamische Oberflächenspannung genannt wird.

Die Konzentrationsänderung an der Oberflächenschicht einer Lösung bezeichnet man als Adsorption. Von den möglichen Fällen von Adsorption interessieren uns hier in erster Linie diejenigen, welche an der Grenzfläche zwischen einer Lösung und einem festen Körper auftreten. Von solchen Adsorptionen wird beim Arbeiten mit Enzymen vielfach Gebrauch gemacht.

Diese hierher gehörenden Erscheinungen sind teilweise schon lange bekannt, wenn auch die Tatsachen bis in die neueste Zeit sich nicht befriedigend haben zusammenfassen lassen.

Wieviel durch einen festen Stoff aus einer Lösung adsorbiert wird, hängt ausser von der Menge des adsorbierenden Stoffes noch von seiner Beschaffenheit und besonders von der Natur des gelösten Stoffes ab.

Ein bekanntes Beispiel ist der Färbeprozess, bei welchem der Lösung durch die tierische oder pflanzliche Faser mehr oder weniger Farbstoff entzogen wird.

Was den Einfluss der Menge des adsorbierenden Stoffes betrifft, so ist in erster Linie die Vergrösserung der Oberfläche der Flüssigkeit für die Adsorption maassgebend; für ein und dasselbe Präparat kann man die wirksame Oberfläche mit der Menge des zugesetzten Adsorbens proportional setzen. Ferner kommt noch eine stoffliche Konstante hinzu, und zwar auch bei denjenigen festen Körpern, wie Kohle, Cellulose etc., wo eine chemische Wechselwirkung mit der adsorbierten Substanz nicht wohl angenommen werden kann. Es handelt sich hier wahrscheinlich um die Grösse der Oberflächenspannung des Wassers gegen diese Stoffe; dieselbe ist ja von der Oberflächenspannung gegen Luft verschieden, und nimmt bei nicht adsorbierenden Pulvern wohl sehr kleine Werte an.

Für die Verteilung des gelösten Stoffes zwischen Lösungsmittel und Oberflächenschicht gilt mit ziemlicher Annäherung die Beziehung:

$$\frac{x}{m} = \text{konst. } c^{-\frac{1}{p}}$$

wo x die vom Adsorptionsmittel angezogene Substanzmenge und m die Menge des Adsorptionsmittels bedeuten; der Exponent $\frac{1}{p}$ hängt von den Komponenten des Systems ab und pflegt Werte zwischen 0,3 und 0,8 anzunehmen.

Eine andere empirische Formel für das Adsorptionsgleichgewicht, welche

ein weiteres Tatsachengebiet umfasst, hat Freundlich (Z. physik. Chem. **57**, 385; 1907) aufgestellt:

$$\frac{v}{m} \ln \frac{a}{a - x} = \lambda = \alpha \left(\frac{a}{v}\right)^{-\frac{1}{n}}.$$

Hier bedeutet a die Gesamtmenge des gelösten Stoffes und v das Flüssigkeitsvolumen. Die Grösse λ ist von der Menge der adsorbierenden Substanz unabhängig, dagegen noch eine Funktion von a und v, und zwar von ihrem Verhältnis; a und n sind Grössen, welche nur von der Temperatur und der Art des gelösten Stoffes abhängen.

Das durch die angegebenen Formeln bestimmte Adsorptionsgleichgewicht muss, wenn die Verkleinerung der Oberflächenspannung die einzige Ursache der Erscheinung ist, offenbar ein vollständig reversibles sein, und unabhängig von dem Weg, auf welchem es herbeigeführt wurde. Das Adsorptionsmittel, welches mit dem adsorbierten Stoff beladen ist, muss denselben also bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichtes an das reine Lösungsmittel abgeben.

Nach dieser reversibeln Adsorption tritt nicht selten eine Folgeerscheinung auf — die Fixierung des adsorbierten Stoffes — welche teils durch eine stoffliche Veränderung derselben (Unlöslichwerden oder dergl.) teils durch eine chemische Reaktion mit dem Adsorbens zustande kommt, eine Reaktion, welche nicht selten zur Zerstörung oder Denaturierung des adsorbierten Stoffes führt. Aus eigentlichen Lösungen werden besonders manche Farbstoffe fixiert, besonders aber tritt diese festere Bindung bei Kolloiden, speziell bei Eiweisskörpern, Toxinen und Enzymen auf. Diese Fixierung ist nicht reversibel. Bei den Toxinen verwickelt sie die Gesamterscheinung der Antitoxinbindung sehr erheblich und hat zu lebhaften Kontroversen Anlass gegeben. Bei den Enzymen kennt man ganz entsprechende Vorgänge, z. B. die Vereinigung zwischen Trypsin und Antitrypsin und ferner die Fixierung mehrerer Enzyme durch Kohle (S. G. Hedin, H. **50**, 497; 1907), auf die wir noch zurückkommen.

Es muss hier gesagt werden, dass sich keineswegs alle Adsorptionserscheinungen auf ein und dieselbe Ursache zurückführen lassen.

Neben den bis jetzt besprochenen, mechanischen Adsorptionen existiert nämlich eine grosse Anzahl von Adsorptionserscheinungen, welche durch chemische Wechselwirkungen veranlasst werden, und insbesondere sind es die sauren und die basischen Farbstoffe, welche von der tierischen Faser nicht mechanisch adsorbiert, sondern chemisch gebunden werden. Es ist ein Verdienst von L. Michaelis, wiederholt die chemische Natur vieler Adsorptionsvorgänge hervorgehoben zu haben.

Wie Michaelis richtig bemerkt (Oppenheimers Handbuch II, **1**, 390) kommt von allen bekannteren Stoffen mechanische Adsorption nur bei Kohle

und bei Cellulose in Betracht. „Fast alle anderen als Adsorbentien bekannten Stoffe wie Kieselsäure, Kieselguhr, Kaolin, Arsensulfid, Mastix, Eisenhydroxyd, Tonerde, Zirkonhydroxyd haben überhaupt kein mechanisches Adsorptionsvermögen und adsorbieren elektro-indifferente Stoffe wie Alkohol, Aceton, Zucker überhaupt nicht. Sie adsorbieren nur Stoffe, die in Ionenform oder in Form elektrisch geladener Suspensionen auftreten können, und zwar immer nur gemäss ihrer elektrischen Ladung. So adsorbiert Kieselsäure nur solche Stoffe, die im elektrischen Stromgefälle nach der Kathode wandern, und Eisenhydroxyd nur solche Stoffe die nach der Anode wandern.“ Es handelt sich also bei diesen Stoffen stets um eine an der Oberfläche des adsorbierenden Stoffes vor sich gehende Neutralisation zwischen einem sauren und einem basischen Stoff. Aber auch Kohle adsorbiert nach Michaelis und Rona (Biochem. Z. **15**, 196; 1908) nicht in allen Fällen rein mechanisch, sondern durch Vermittlung elektrischer Kräfte.

Kolloide. Die Adsorptionserscheinungen, welche uns bei dem Studium der Enzyme am meisten interessieren, sind diejenigen, an welchen Kolloide beteiligt sind. Einerseits können diese Stoffe im festen, resp. gelatinierten Zustand selbst als Adsorptionsmittel fungieren, andererseits werden sie selbst von festen Körpern weitgehend adsorbiert.

Wir können uns bei der folgenden Übersicht auf die eine der beiden grossen Gruppen beschränken, in welche die kolloiden Stoffe sich einteilen lassen, nämlich auf die sog. Emulsions-Kolloide oder Emulsoide, und können von der Besprechung der Suspensions-Kolloide oder Suspensoide, welche in enzymhaltigen Lösungen oder beim Arbeiten mit solchen kaum eine Rolle spielen, ganz absehen.

Während die Suspensoide, zu welchen beispielsweise die kolloiden Metalle gehören, sich an die eigentlichen makroskopischen Suspensionen anreihen, stehen die Emulsoide den Kristalloiden so nahe, dass eine scharfe Grenze hier nicht gezogen werden kann. Bei einer Reihe von Körperklassen tritt nämlich mit wachsender Molekularformel die Tendenz hervor, Komplexe zu bilden und so in den kolloiden Zustand überzugehen. Die Kondensationsprodukte der Glukose, Dextrin und Stärke, sowie die Polypeptide E. Fischers und nach F. Kraffts Untersuchungen (Chem. Ber. **28** und **29**) besonders die Fettsäuren bilden hierfür gute Beispiele. Während die niedrigen Fettsäuren normale Ionisation und normalen osmotischen Druck zeigen, tritt z. B. schon das Natriumsalz der Laurinsäure, $C_{12}H_{23}O_2Na$ hauptsächlich in Doppelmolekülen auf, und Natriumoleat, $C_{18}H_{33}O_2Na$ ruft nach Krafft in 20%iger Lösung überhaupt keine messbare Siedepunktserhöhung mehr hervor, es verhält sich also wie ein Stoff von unendlich grossem Molekulargewicht. So ist der Übergang der Eigenschaften von den Emulsionskolloiden zu den Kristalloiden kontinuierlich. Der osmotische Druck und die damit zusammenhängenden Grössen werden schon auf Grund der einfachsten möglichen

Molekularformeln sehr klein, und nehmen durch die mit steigendem Molekulargewicht wachsende Tendenz zur Komplexbildung noch weiter ab. Die beobachteten Werte fallen dann oft in die besonders durch ungenügende Reinigungsmethoden verursachten bezw. in die unvermeidlichen Fehlergrenzen, oder sind wegen des chemisch ungenügend definierten Materiales von untergeordneter Bedeutung. Wo aber bei hochkondensierten Körpern, wie Stärke, Glykogen u. a. die Reinigung weit fortgeführt werden konnte, berechnen sich aus Gefrierpunktserniedrigungen und Siedepunktserhöhungen Molekulargewichte von wenigstens 100000, Zahlen, welche indessen nur als untere Grenzwerte anzusehen sind.

Was speziell die Molekulargewichte von Enzymen angeht, so ist — wenn man die Oxydasen aus Medicago ausnimmt, welche Verf. und Bolin (H. **61**) untersucht haben — bis jetzt noch nichts Sicheres bekannt; die Reinigungsmethoden sind hier noch zu wenig erfolgreich gewesen. Aus Diffusionsversuchen, die an käuflichen Enzympräparaten angestellt sind (R. O. Herzog und Kassarnowski, Z. f. Elektrochem. **13**), Schlüsse auf die Molekulargrösse zu machen, ist wohl einigen Bedenken unterworfen, und die Berechnung, welche man nach der Regel des Verf. (Wied. Ann. **63**, 273, 1897) $D\sqrt{M} = \text{konst.}$ anstellen könnte, macht vorläufig eine zu grosse Extrapolation erforderlich, als dass einigermassen sichere Werte erhalten werden könnten. Immerhin zeigen auch die Versuche von Herzog wie die älteren von Graham, dass auch bei den Kolloiden eine Ausbreitung des gelösten Stoffes im Lösungsmittel erfolgt und also ein prinzipieller Unterschied auch in dieser Hinsicht nicht besteht. Ob freilich in allen diesen Fällen eine solche Ausbreitung in erster Linie von osmotischen Kräften herrührt, ist nicht sicher, da bekanntlich die sog. Brownsche Bewegung sogar bei Suspensoiden von etwa 0,01 mm Durchmesser gegen die Wirkung der Schwerkraft eine Verteilung hervorruft.

Die Brownsche Molekularbewegung besteht bekanntlich darin, dass kleine, in einem Lösungsmittel suspendierte Teile sich in einer dauernden unregelmässigen Bewegung befinden, und zwar um so lebhafter, je feiner der suspendierte Stoff verteilt ist und je geringere innere Reibung die Flüssigkeit besitzt.

Diese Bewegung ist als eine Äusserung der allgemeinen Molekularbewegung der Materie aufzufassen, wie sie die kinetische Theorie der Wärme schon seit der Mitte vorigen Jahrhunderts angenommen hat. Während bei den Suspensionskolloiden die Brownsche Bewegung eingehend studiert worden ist, liegen diesbezügliche Angaben über Emulsionskolloide nicht vor.

Im Ultramikroskop von Siedentopf und Zsigmondy zeigen die Emulsoide meist nur einen Kegel diffusen Lichtes, d. h. die Teilchen sind meist zu klein, um ultramikroskopisch diskret wahrgenommen werden zu können.

Die mikroskopisch sichtbaren Teilchen erstrecken sich bis zum Diameter von etwa $2 \cdot 10^{-5}$ cm („Mikronen“). Als Submikronen bezeichnet man die ausschliesslich ultramikroskopisch wahrnehmbaren Partikeln, während diejenigen Teilchen, deren Existenz wir im Ultramikroskop nur indirekt wahrnehmen können, Amikronen genannt werden; ihr Diameter liegt etwa zwischen $5 \cdot 10^{-7}$ und $1 \cdot 10^{-7}$ cm.

Alles deutet übrigens darauf hin, dass die kolloiden Lösungen als Mischungen von grösseren und kleineren Molekülaggregaten anzusehen sind, welche mehr oder weniger schnell ineinander übergehen können. Chemisch am wirksamsten müssen stets die kleinsten, somit die wirklich gelösten Teile sein, und so erklärt es sich wohl, dass kolloide Stoffe bei chemischen Umsetzungen den theoretisch für gelöste Stoffe abgeleiteten Reaktionsgesetzen folgen.

Die Oberflächenspannung des Wassers wird durch Emulsionskolloide sehr erheblich herabgesetzt, wie schon die qualitative Beobachtung lehrt. Nach Quincke (Wied. Ann. **35**) ist σ einer 10%igen Gerbsäurelösung 29% kleiner als der gleiche Wert für Wasser; die Oberflächenspannung einer verdünnten Gelatinelösung ist 28% geringer. Demgemäss zeigen auch diese Stoffe eine ausgesprochene Neigung, sich an der Oberfläche der Lösungen zu konzentrieren, und werden stark adsorbiert.

Was die erstere Erscheinung betrifft, die Anhäufung des Kolloids an der Oberfläche, so äussert sie sich in besonders auffallender Weise durch die Bildung von festen Peptonhäutchen, welche sich aus dem gallertartig gewordenen Pepton an der Oberfläche, sei es durch eine chemische Umwandlung oder ohne eine solche bilden.

Ebenso deutlich tritt die Anhäufung von Emulsionskolloiden an der Oberfläche der wässerigen Lösung zutage, wenn man die Flüssigkeit schüttelt und den Schaum auf seine Zusammensetzung untersucht. Übrigens deutet die grosse Schaumbeständigkeit vieler Lösungen z. B. von Albuminen, auf eine Anreicherung an diesen Stoffen.

Mit der Oberflächenspannung dürfte die Grenzflächenspannung, wie schon erwähnt, meist parallel gehen, weshalb eine starke Adsorption an den Grenzflächen gegen Stoffe wie Kohle, Cellulose, Tonerde etc. zu erwarten ist.

Emulsionskolloide scheinen hier manchmal der gleichen Formel

$$\frac{x}{m} = \text{konst.} \, . \, c^{-\frac{1}{p}}$$

zu folgen, wie wirklich gelöste Stoffe (vergl. Wislicenus, Kolloid-Zeitschr. **2**), soweit nämlich nicht chemische und elektrische Kräfte ins Spiel treten. Meist ist jedoch bei der Adsorption von Kolloiden die adsorbierte Menge von der Menge des anwesenden Wassers, also der Konzentration, unabhängig.

Feste, neutrale Adsorptionsmittel.

Kohle ist als Adsorbens für Enzyme mehrfach verwendet worden. So hat S. G. Hedin (Biochem. Journ. **1**, 484; 1906 und **2**, 81; 1907, sowie H. **50**, 497; 1907) gezeigt, dass Trypsin von Tierkohle adsorbiert wird. Bei

Anwendung von genügenden Mengen Tierkohle ist die Adsorption vollständig. Sie ist zunächst reversibel. Dann aber tritt der schon erwähnte Prozess ein, welcher an adsorbierten, organischen Substanzen nicht ungewöhnlich ist, die Fixierung. Die Fixierung ist ein relativ langsam verlaufender Vorgang; die fixierte Menge Trypsin ist um so grösser, je grösser die Menge der Tierkohle und je höher die Temperatur ist. Während also durch Wasser die fixierte Trypsinmenge der Tierkohle nicht mehr entzogen werden kann, ist Kasein imstande, der Kohle Trypsin zu entreissen und zwar um so mehr, je höher die Temperatur ist. Ganz ähnlich wie Trypsin verhält sich sowohl Kohle als Talkum dem Lab gegenüber (Hedin, H. **60**, 364; 1909); auch dieses Enzym kann der Kohle durch das Substrat entzogen werden.

Nach demselben Verf. werden ferner die in der Rindermilz vorkommenden Enzyme, α- und β-Protease, von Tierkohle aufgenommen, und zwar in gleichen Verhältnissen.

In Übereinstimmung mit den Resultaten Hedins stehen die Befunde von E. Buchner und F. Klatte (Biochem. Z. **9**, 436; 1908), nach welchen Trypsin durch Seide, Wolle und Baumwollfäden, durch Leinwand- und Papierstreifchen, Agar-Agarstränge, Asbest- und Glaswolle aus verdünnter Lösung adsorbiert wird.

Lipase kann einer Lösung durch Kohle vollständig entzogen werden, und zwar sowohl bei alkalischer als saurer Reaktion, und das gleiche Verhalten zeigte Kaolin (L. Michaelis und P. Rona, Biochem. Z. **4**, 11; 1907. — L. Michaelis, ebenda **7**, 488; 1908. Vergl. auch L. Michaelis und M. Ehrenreich, ebenda **10**, 283; 1908).

Besonders bemerkenswert ist, dass Kolloide sich bei der Adsorption durch Kohle u. dergl. gegenseitig beeinflussen können, und dass sogar Krystalloide, wie Traubenzucker die Aufnahmefähigkeit der Kohle für andere Krystalloide verringern können, vermutlich durch Änderung der Oberflächenspannung.

Hierauf beruht die von Hedin (H. **63**, 143; 1909) studierte Erscheinung, dass die Hemmung der Labwirkung durch Kohle durch verschiedene Stoffe verhindert wird.

Den genannten neutralen Adsorptionsmitteln, welche gewöhnlich in Pulverform angewandt werden, reihen sich die Stoffe an, welche in Form fester Wände oder Schichten die Adsorption bewerkstelligen, also Cellulose in Form von Filtrierpapier (hierauf beruhen die Versuche von Grüss [Bot. Ber. **26**a, 191; 1908 und **27**, 313; 1909] über Kapillaranalyse von Enzymen), ferner die Materialien der verschiedenen Filterkerzen, wie das Chamberlandfilter usw. Ihr Verhalten gegen Enzyme wird hauptsächlich durch ihre Fähigkeit charakterisiert, dieselben bei der Filtration durchzulassen oder zurückzuhalten. Hierfür kommt allerdings die Molekulargrösse bezw. die Teilchengrösse des zu filtrierenden Stoffes in Betracht, so dass das Filter nicht nur als Adsorptionsmittel, sondern direkt als Sieb wirkt; indessen ist die Adsorp-

tion bei den Emulsionskolloiden doch wohl meistens der ausschlaggebende Vorgang. Wir erwähnen folgende Angaben.

Chamberlandfilter.

Aufgehalten werden:

Lipasen verschiedener Herkunft nach Fermi und Pernossi, Ann. Inst. Pasteur **3**, 531; 1889;

Hefeninvertase nach Fermi und Pernossi, Ann. Inst. Pasteur **3**, 531; 1889;

Zymase nach Buchner (Zymasegärung, München 1903);

Pepsin und Trypsin.

Durchgelassen werden:

Maltase nach Hill, J. Chem. Soc. **73**, 636; 1898;

Magensteapsin nach Volhard, Z. klin. Med. **42**, 414; 1901;

Leberaldehydasen nach Jacoby, H. **30**, 135; 1900;

Proteinasen des Malzsaftes nach Fernbach und Hubert, C. r. **130**, 1783; **131**, 293; 1900.

Pergament.

Aufgehalten werden:

Pepsin nach Hammarsten, Malys Jahresb. **3**, 160;

Peroxydase nach Euler und Bolin, H. **61**, 82; 1909.

Durchgelassen werden:

Invertin, Amylase } nach Chodschajew, Arch. de physiol. **30**, 241; 1898;
(langsam) Emulsin, Trypsin, Pepsin }

Labferment und Pepsin gehen durch ungespannte Amnionmembran. Jacoby, Biochem. Z. **1**, 53; 1906;

Labferment, Invertin und Katalase gehen durch Darmmembran. Vandevelde, Biochem. Z. **1**, 408; 1906;

Labferment, Invertin und Katalase gehen nicht durch Cellulosewandungen (Hülsen von Leune-Paris. Vandevelde, l. c.)

Kollodiummembranen.

Aufgehalten werden:

Pepsin nach Strada, Ann. Inst. Pasteur **22**, 982; 1908.

Durchgelassen werden:

Emulsin und Laktase nach Bierry und Schaeffer, Soc. Biol. **62**, 723; 1907.

Trypsin teilweise
„ nach Aktivierung mit Kinase vollständig } Strada, l. c.

Da Kolloidsole durch tierische Membranen und Kolloidhäute im allgemeinen nicht diffundieren, so lassen sich als Kolloidfilter sehr verschiedene Membranen verwenden.

Durch Abstufung des Kolloidgehaltes einer Unterlage aus Cellulose oder dergl. kann man die Durchlässigkeit von Filtern nach Bedürfnis variieren und fraktioniert filtrieren. Nach diesem Prinzip hat Bechhold seine Ultrafilter hergestellt, bei welchen als Kolloide besonders Eisessigkolloidium und Gelatine zur Anwendung kommen (Z. physik. Chem. **60**, 257; 1907. **64**, 328; 1908).

Fibrinflocken haben sich zur Adsorption mancher Enzyme wie Lab resp. Pepsin (Jacoby, Biochem. Z. **4**, 21; 1907) und Trypsin (Buchner und Klatte, Biochem. Z. **9**, 436; 1908) wirksam erwiesen. Auch zahlreiche andere koagulierte Eiweisskörper zeigen starke Adsorptionskraft.

(Vergl. auch Bayliss, Adsorption in ihrer Beziehung zur Enzymwirkung. Kolloid. Zeitschr. 1908.)

Feste saure oder basische Bestandteile. Hier kommen besonders in Betracht einerseits die Hydroxyde des dreiwertigen Eisens, des Aluminiums und Magnesiums und gewisse der sog. kolloiden Metalle (Rona, Biochem. Z., Deleano, ebenda **19**, 266, 1909), andererseits Kieselsäure. Die chemische Bindung tritt hier gegenüber der mechanischen Adsorption in den Vordergrund; dies zeigt sich besonders durch die Auswahl derjenigen Sole, welche kräftig adsorbiert werden, nämlich saure Stoffe durch die Metallhydroxyde, basische Stoffe durch Kieselsäure; eine Regelmässigkeit, welche auch bei der gegenseitigen Ausflockung der Kolloide zutage tritt.

Auch bei der Adsorption der Enzyme macht sich der gleiche Einfluss geltend. Wie Michaelis (Biochem. Z. **7**, 488; 1907) gefunden hat, geben die elektro-negativen kolloiden Lösungen z. B. mit dem Invertin keine Ausfällungen, wogegen die Hydroxyde des Eisens und Aluminiums das Invertin vollkommen adsorbieren. Ebenso verhält sich Pepsin (Biochem. Z. **10**, 283; 1908). Dagegen hängt die Adsorption von Amylase und Speicheldiastase (Ptyalin) von der Reaktion des Mediums ab. Zymase scheint ein neutraler Stoff zu sein (Michaelis und Rona) und wird demgemäss von Eisenhydroxyd nicht adsorbiert; dagegen scheint es, dass das Ko-Enzym der Zymase von Eisenhydroxyd leicht adsorbiert wird; (Resenscheck, Biochem. Z. **15**, 1; 1908).

Zu den sauren Adsorptionsmitteln gehört auch Kaolin, welches demgemäss vorwiegend basische Stoffe adsorbiert. Da sich die Regel, dass saure Adsorptionsmittel basische Stoffe und umgekehrt basische Adsorptionsmittel saure Stoffe adsorbieren, als ziemlich allgemein gültig erwiesen hat, so ist man umgekehrt imstande, aus Beobachtungen über Adsorption Schlüsse auf die elektrochemische Natur, bezw. die Ladung von adsorbierbaren Stoffen, speziell von Enzymen zu machen. Diese Schlüsse werden nun durch andere Tatsachen auffallend gut bestätigt.

Elektrische Überführung. Unter der Einwirkung eines elektrischen Potentialgefälles wandern Emulsionskolloide in derselben Weise, wie

suspendierte, in Wasser aufgeschlämmte Stoffteilchen; man bezeichnet diesen Effekt bekanntlich als Kataphorese. Während aber suspendierte Teilchen in der Regel zum positiven Pol wandern, und selbst negative Ladung annehmen (es beruht dies nach der Regel von Coehn darauf, dass die Dielektrizitätskonstante dieser Partikelchen kleiner ist als die des Wassers), so wandern Emulsionskolloide teils zum positiven, teils zum negativen Pol. Es ist dies verständlich, wenn man bedenkt, dass Emulsionskolloide in der Regel basische oder saure Eigenschaften haben, oder — als amphotere Elektrolyte — je nach dem Medium bald den einen, bald den anderen Charakter zeigen können. Die Ladung, welche sie durch die Ionisation annehmen, bestimmt, wie bei den Ionen überhaupt, die Wanderungsrichtung. Auch die Wanderungsgeschwindigkeit ist von derjenigen der gelösten Ionen nicht wesentlich verschieden; nach Whitney und Blake ist sie für Gelatineteilchen

$$25 . 10^{-5} \text{ cm/sec.}$$

für 1 Volt/cm, während der entsprechende Wert für Na-Ionen $43 . 10^{-5}$ beträgt. Dagegen treten bei der Kataphorese der Emulsionskolloide verschiedene erhebliche Störungen auf, welche zum Teil dadurch verursacht sind, dass die Teilchen von beiden Elektroden aus wandern und sich dann in der Mitte als entgegengesetzt geladene Sole fällen.

Wie stark die elektrische Überführung von Proteinen von der Reaktion des Mediums abhängt, ersieht man am besten aus den Versuchen von Pauli (Hofm. Beitr. **7**, 531; 1906). Elektrolytarmes Eiweiss war durch eine Spannung von 250 Volt nicht fortbewegt worden, während das Eiweiss schon in 0,01 norm. HCl-Lösung elektropositiven Charakter, in verdünnten Laugen negativen Charakter gewinnt.

Pauli und Handovsky (Biochem. Z. **18**, 340; 1909), sowie Michaelis haben diese Verhältnisse neuerdings wieder eingehend studiert.

Die wichtigsten Resultate über die elektrische Überführung von Enzymen verdankt man Michaelis. Er fand zunächst (Biochem. Z. **16**, 81; 1909), dass Invertin unabhängig von der Reaktion des Mediums deutlich zur Anode wandert, und dass es demgemäss eine ausgesprochene Säure ist. Sodann hat man auch beim Pepsin den stark negativen Charakter durch Überführungsversuche erwiesen; es wandert in neutraler und sogar in stark saurer Lösung rein anodisch. Bald darauf (Biochem. Z. **17**, 831; 1909) ist es auch gelungen, durch elektrische Überführung bei einem Gehalt von über $^1/_{50}$ norm. HCl das Pepsin nach der Kathode zu führen, und die Übereinstimmung mit der Adsorptionsanalyse ist sonach vollständig. Trypsin und Diastase verhalten sich hingegen auch im elektrischen Feld wie amphotere Substanzen, sie wandern je nach der Reaktion der Lösung anodisch oder kathodisch, jedoch ist Diastase stärker positiv, Trypsin stärker negativ.

Neuerdings (Biochem. Z. **19**, 181; 1909) hat Michaelis die „relative Aziditäť“ einiger Enzyme bestimmt. Ist

$$K_a\ [\text{undissoz. Albumin}] = [H^+]\ [Alb^-]$$

und

$$K_b\ [\text{undissoz. Albumin}] = [OH^-]\ [Alb^+]$$

so ist im isoelektrischen Zustande, d. h. wenn gleich viel positive und negative Eiweissionen vorhanden sind

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H^+]}{[OH^-]}$$

Dieser Quotient nimmt folgende Werte an:

Malzamylase	1	Trypsin	10^5—10^8
Serumalbumin	10^2—10^3	Pepsin	10^{10}
		Hefeinvertase	∞.

Auch Bierry, V. Henri und Schaeffer haben mit Enzymen Überführungsversuche angestellt (Soc. biol. **63**, 226; 1907, und Biochem. Z. **16**, 473; 1909) und zwar mit dialysierten Fermentlösungen. Zur Untersuchung kamen: Amylasen tierischer und pflanzlicher Herkunft, Invertin aus Hefe und aus Helix pomatia, Emulsin aus Mandeln und aus Helix pomatia, Laktase von Helix pomatia, Lab (von Hansen) und Katalase aus Leber. Von allen diesen Enzymen wanderte nur eines zur Kathode, nämlich die Pankreasamylase, alle übrigen gingen zur Anode.

Schon in 0,01 norm. NaCl-Lösung nimmt Eiweiss elektropositiven Charakter an, während es sich in verdünnten Laugen elektronegativ verhält. Elektrolytarmes Eiweiss sollte nach Paulis ursprünglichen Angaben nicht fortbewegt werden; indessen zeigte eine eingehendere Untersuchung von Pauli und Handovsky (Biochem. Z. **18**, 340; 1909) und besonders von Michaelis (ebenda, **19**, 181; 1909), dass neutrales Eiweiss bezw. Eiweiss am isoelektrischen Punkt — bei einem Aziditätsgrade von etwa $[H] = 10^{-6}$ — nicht stillsteht, sondern ebenfalls wandert, und zwar gleichzeitig sowohl anodisch und kathodisch.

Literatur: Michaelis, Dynamik der Oberflächen. Dresden 1909.

Sehr eingehend ist die fällende Wirkung der Salze auf die Kolloide studiert worden, wobei ganz besonders der Einfluss der Alkalisalze auf die Eiweisskörper berücksichtigt wurde.

Die grundlegenden Arbeiten hierüber und die Anwendung der Salzfällung zur Fraktionierung von Eiweissgemischen verdankt man Hofmeister, welcher bereits 1887 die Salze nach ihrer fällenden Wirkung ordnete. In neuerer Zeit sind seine Arbeiten durch Wo. Pauli (Hofm. Beitr. **3**, **5**, **7** Biochem. Z. **17**, u. ff.) wesentlich erweitert worden.

Es hat sich gezeigt, dass die fällenden Eigenschaften der Salze sich additiv aus den Wirkungen der Kationen und der Anionen zusammensetzen. Die folgenden Reihen beginnen mit dem am stärksten fällenden, bezw. am wenigsten lösenden Ion:

SO_4, HPO_4, CH_3CO_2, Cl, NO_3, Br, J, CNS
Li, Na, K, NH_4.

Die Aufeinanderfolge dieser Stoffe stimmt vollständig mit der untenstehenden Serie überein, welche Verf. (Z. physik. Chem. **31** und **49**) für die Aussalzung von Nichtelektrolyten aufgestellt hat. Dieselbe enthält die mittlere relative molekulare Löslichkeitserniedrigung $(l_w - l_s) : l_s$, wo l_w die Löslichkeit eines Nichtelektrolyten in Wasser, l_s die Löslichkeit in einer 1 norm. Salzlösung bedeutet.

NH_4NO_3 0	K Cl 0,23	$^1/_2$ Zn SO_4 0,31
KJ 0,02	$^1/_2$ Ba Cl_2 . . . 0,24	$^1/_2$ K_2SO_4 0,32
KBr 0,05	$^1/_2$ Ca Cl_2 . . . 0,24	$^1/_2$ Na_2SO_4 0,35
KNO_3 0,08	Na Cl 0,25	$^1/_2$ Na_2CO_3 0,36
$NaNO_3$ 0,10	$^1/_2$ $(NH_4)_2SO_4$ . . 0,29	Na OH 0,36
Li Cl 0,21	$^1/_2$ Mg SO_4 . . . 0,31	

Es ist also zweifellos, dass wir es in beiden Fällen mit der gleichen Erscheinung zu tun haben. Besonders sieht man, dass Ammonium- und Magnesiumsulfat, welche zur Ausfällung von Eiweissstoffen und auch von Enzymen besonders häufig Verwendung finden, auch Kristalloiden gegenüber kräftig wirksam sind.

Auffallend ist die von Freundlich und von Höber näher studierte Tatsache, dass die Geschwindigkeit des Elektrolytzusatzes die Vollständigkeit der Ausfällung beeinflusst.

Setzt man den Eiweisslösungen geringe Mengen Säuren oder Alkalien zu, so wird dadurch die fällende Wirkung der Salze modifiziert, so dass die Reihenfolge der Ionen eine andere wird (Posternak, Ann. Inst. Pasteur **15**). Auch die Ausfällungen von Eiweisskörpern durch die Salze der Erdalkalien weisen Besonderheiten auf, welche Pauli (Hofm. Beitr. **5**) näher studiert hat. Im Gegensatz zu den bei nativer Reaktion durch Alkalimetalle und Mg erzeugten Fällungen sind die durch die Erdalkalisalze hervorgerufenen irreversibel; sie unterscheiden sich jedoch deutlich von den durch Schwermetalle erzeugten. In stark sauren Lösungen treten übrigens, besonders bei Zugabe von Alkalisalzen, irreversible Fällungen ein.

Überhaupt wird die Wirkung von Neutralsalzen auf Eiweiss durch Zusatz von Säuren in hohem Grade modifiziert. Versetzt man ein sorgfältig dialysiertes Serumeiweiss mit etwas Säure, so hat dasselbe nicht nur die Fähigkeit erlangt, im elektrischen Strome zum negativen Pole zu wandern, sondern zugleich seine Koagulierbarkeit durch Alkohol und durch Hitze eingebüsst. Gleichzeitig hat seine innere Reibung eine mächtige Erhöhung erfahren. Durch Überschuss von Säure wird die Alkoholfällbarkeit restituiert und die erhöhte Viskosität wieder herabgesetzt. Ebenso wie Säureüberschuss wirkt ein Zusatz von irgend einem Neutralsalz in bezug auf die Herstellung der Gerinnbarkeit von Säureeiweiss durch Hitze und Alkohol und auf die Abnahme der inneren Reibung.

Durch die bedeutend grössere innere Reibung ihrer Lösungen unterscheiden sich die Emulsionskolloide von den Pseudolösungen der Suspensionskolloide, welch letztere oft nur unerheblich grössere Zähigkeit besitzen als das reine Medium. Schon kleinere Zusätze von Salzen, besonders aber von Säuren und Basen rufen bei Eiweisskörpern eine starke Änderung der Viskosität hervor, woraus zu schliessen ist, dass die Eiweissionen stärkere innere Reibung erzeugen als amphoteres Eiweiss.

Der Verlauf der Proteolyse ist mehrfach durch Messung der inneren Reibung verfolgt worden, ohne dass die Parallelität zwischen der Zusammensetzung der Lösung und ihrer inneren Reibung genügend sicher gestellt worden wäre.

Gallerten. Zahlreiche kolloidhaltige Flüssigkeiten, welche zur Kennzeichnung ihrer Konsistenz Sole genannt werden, erstarren durch Zusätze von Salzen, Alkohol oder dergl. zu einer scheinbar homogenen Masse von eigenartiger, halbfester Beschaffenheit, einer sogen. Gallerte. Unter den Suspensionskolloiden sind die Kieselsäure und die Tonerde, unter den Emulsionskolloiden Agar-Agar und Gelatine die besten Beispiele. Die Homogenität ist indessen nur scheinbar. Wenn auch bei weitem nicht in allen, so kann man doch in vielen Fällen im Mikroskop wahrnehmen, dass beim Erstarren eine Entmischung stattgefunden hat. Den Verlauf derselben hat Hardy mikroskopisch verfolgt. Eine scharfe Grenze besteht indessen zwischen Solen und Gelen wohl nicht, und Pauli hat wohl recht, wenn er betont (Biochem. Z. **18**, 367), dass zwischen festen und flüssigen Gallerten nur ein gradueller Unterschied besteht, und dass eine Gallerte nichts anderes ist, als ein dickes Sol.

Salze, bezw. Ionen üben nach Pauli (Hofm. B. **2**), denselben relativen Einfluss auf Ausflockung wie auf die Gelatinierung aus, so dass also die oben angegebene Reihenfolge SO_4 — Cl — CNS auch für die Veränderung des Schmelz- bezw. Erstarrungspunktes der Gelatine gilt. Eine entsprechende Parallelität hatte bereits früher Hofmeister für die Ausflockung und Quellung gefunden.

Kap. III.

Aktivatoren (Ko-Enzyme), Paralysatoren und Gifte.

Aktivatoren oder Ko-Enzyme sind zweifellos für das Zustandekommen enzymatischer Reaktionen von grösserer und allgemeinerer Bedeutung als man bis vor kurzem angenommen hat. Vielfach tritt ein enzymatischer Vorgang ohne Mitwirkung eines spezifischen Ko-Enzyms überhaupt nicht ein; stets aber wird der zeitliche Verlauf stark beeinflusst, und so erweist es sich denn als notwendig, diejenigen chemischen Stoffe, welche die Aktivierung oder Inaktivierung der Enzyme bewirken, möglichst vollständig qualitativ und quantitativ kennen zu lernen. Den bedeutenden Einfluss der Säuren und Basen, bezw. der H^+ und OH^--Konzentrationen auf enzymatische Vorgänge hat neuerdings Sörensen mit Recht scharf betont und auf Grund eingehender Versuche an Invertase, Katalase und Pepsin zahlenmässig festgestellt. Hinsichtlich des zwar nicht so allgemeinen, aber nicht minder wichtigen Einflusses von Neutralsalzen und Nichtelektrolyten besitzen wir eine derartig umfassende Untersuchung noch nicht, und wir müssen uns daher im wesentlichen auf eine Zusammenstellung der zahlreichen qualitativen Ergebnisse beschränken.

Eine Anzahl der in Rede stehenden, an einer enzymatischen Reaktion beteiligten Stoffe hat man als Ko-Enzyme bezeichnet. Dieser jetzt sehr gebräuchlich gewordene Name ist insofern nicht ganz zutreffend, als er den Stoff als ein Enzym charakterisiert, während es sich teilweise um anorganische, teilweise um organische kochbeständige Substanzen von bekannter Zusammensetzung handelt. Am geeignesten ist wohl die Bezeichnung „Aktivatoren“ für alle Stoffe, welche — spezifisch oder nicht — gemeinsam mit einem Enzym eine Reaktion beschleunigen.

Nach der gebräuchlichen Auffassung und Nomenklatur hätte man zwischen denjenigen Körpern zu unterscheiden, welche „Zymogene“ in den aktiven Zustand überführen — Kinasen — und andererseits solchen Stoffen, welche Enzymwirkungen verstärken. Indessen dürften Kinasen nicht wesentlich anders wirken als die übrigen Aktivatoren, welche im folgenden erwähnt sind.

Kinasen unbekannter Zusammensetzung.

Bekanntlich wird das Trypsin, wie es sich im Pankreassaft vorfindet, erst durch einen Bestandteil des Darmsaftes, die Enterokinase[1]) (Pawlow und Mitarbeiter 1900) aktiviert. Während die Enterokinase von mehreren Forschern, besonders Zunz, als Enzym betrachtet wird, haben Hamburger und Hekma (Journ. de Physiol. et Path. gén. 1902 und 1904) wichtige Belege für ihre Ansicht beigebracht, dass es sich bei der Bildung des Trypsins nicht um eine neue Enzymwirkung auf das Trypsinogen handelt, sondern dass eine bestimmte Menge Enterokinase nur eine bestimmte Menge Pepsinogen aktivieren kann.

Die Reindarstellung der Enterokinase hat Delezenne versucht (Soc. Biol. **53** und **54**). Sie lässt sich mit Calciumphosphat oder mit Alkohol aus dem Darmsaft ausfällen. Auch Fibrinflocken und rote Blutkörperchen adsorbieren die Kinase; erstere quantitativ.

Die Enterokinase ist im Gegensatze zu den meisten Aktivatoren nicht hitzebeständig, sie wird schon bei 67° innerhalb 3 Stunden zerstört.

Eine Kinase unbekannter Natur spielt nach Morawitz (Hofm. Beitr. **4** und **5**) auch bei der Bildung des Thrombins eine Rolle; sie führt Thrombogen in α-Prothrombin über, welches seinerseits durch Kalk in Thrombin verwandelt wird.

Die Thrombokinase soll nicht hitzebeständig sein; eingehendere Versuche hierüber wären wünschenswert.

Gleichfalls der Zusammensetzung nach unbekannt ist der von Danilewski erwähnte, von Schapirow näher untersuchte organische Aktivator Stimulin.

Cohnheim hat bekanntlich neuerdings gefunden, dass sich aus gekochtem Katzenpankreas ein Extrakt gewinnen lässt, welcher das glykolytische Ferment der Muskeln stark aktiviert. Anhaltspunkte über die chemische Natur dieses interessanten Aktivators sind wohl noch nicht vorhanden. Er wird durch Phosphorwolframsäure gefällt (Hall, Amer. Journ. of Physiol. **18**).

Spezielle organische Aktivatoren.

Für Pankreaslipase konnte neuerdings die chemische Natur eines organischen Aktivators festgestellt werden. Nach den Beobachtungen von Pawlow und Bruno, Rachford, Magnus und Loevenhart (Zbl. f. Physiol. **20**, 47; 1906) verstärken gallensaure Salze die Fettspaltung durch Pankreassaft. Das kochbeständige Ko-Enzym, welches R. Magnus (H. **42**) aus der Leber gewonnen hat, enthält nun gerade diese gallensauren Salze.

[1]) Über die Darstellung siehe Bayliss, Journ. of Physiol. **30**, 80; 1904.

Auch mit den Natriumsalzen der synthetischen Glykocholsäure und Taurocholsäure wird der gleiche Effekt erzielt. Durch Dialyse ist das Ko-Enzym von der Leberlipase trennbar. Indessen beschleunigen, wie hervorzuheben ist, diese Stoffe spezifisch die Pankreaslipase, nicht die Magenlipase (Laqueur, Hofm. Beitr. 8) oder die Darmlipase (Boldyreff, Zbl. f. Physiol. **18**. — H. **50**, 394; 1907).

Dass Galle auch einen Aktivator für Trypsin enthält, ist seit langer Zeit bekannt (Rachford, Journ. of Physiol. **25**, 165; 1899. — Delezenne, Soc. Biol. **54**. — v. Fürth und Schütz, Hofm. Beitr. **9**. — Wohlgemuth, Biochem. Z. **2**).

Aminosäuren sind bemerkenswerte Aktivatoren der Amylase (vgl. Kap. IV, ferner Ford und Guthrie, Chem. Zbl. 1908. I. 1470). Auch Pankreassaft wird durch Aminosäuren aktiviert. Wohlgemuth (Biochem. Z. **2**) fand diesen Effekt bei Glykokoll, Alanin u. a. Repräsentanten dieser Gruppe.

Lecithin beschleunigt nach Reichel und Spiro die Labwirkung in geringem Grad (Hofm. Beitr. **7**, 504; 1905). Viel wichtiger ist die Aktivierung, welche Zymase durch Lecithin und andere organische Phosphorverbindungen erfährt. Solche Phosphorverbindungen sind, wie die Untersuchungen von Harden, Young, Buchner und Meisenheimer ergeben haben, der wirksame Bestandteil im gekochten Hefepresssaft. (Vgl. S. 39 und Kap. IV.)

Säuren, Basen und Neutralsalze.

Zwischen den rein spezifischen Aktivatoren bezw. Katalysatoren und den allgemeinen Wirkungen der Säuren und Basen lassen sich bestimmte Grenzen kaum ziehen. So kann die Wirkung der Milchsäure auf Ricinuslipase nach Hoyers Untersuchungen (H. **50**, 414; 1906) zwar durch andere Säuren hervorgerufen werden, ist aber doch stärker, als dem Dissoziationsgrade dieser spezifischen „Samensäure“ entspricht. Ähnliche Verhältnisse treffen wir beim Pepsin.

Pepsin erfordert als unbedingt notwendigen Aktivator eine freie Säure. Im Organismus ist es bekanntlich die Salzsäure, welche das pepsinbildende Sekret der Magenschleimhaut, das „Pepsinogen“ oder Propepsin Langleys in das wirksame Enzym verwandelt.

Über die Ersetzbarkeit der Salzsäure liegen zahlreiche Arbeiten vor; unter den älteren sind diejenigen von Pfleiderer (Pflüg. Arch. **66**), Moraczewski, Hahn (Virch. Arch. **137**) und Sjöquist (Skand. Arch. f. Physiol. **5**) zu nennen. Einer Arbeit von Larin (Biochem. Zbl. **1**, 484; 1905) entnehme ich die nachstehende Tabelle, in welcher die Säuren nach der Stärke ihrer beschleunigenden Wirkung geordnet sind:

Larin:		Sjöquist:
1. Salzsäure	7. Milchsäure	1. Salzsäure
2. Oxalsäure	8. Ameisensäure	2. Phosphorsäure
3. Salpetersäure	9. Äpfelsäure	3. Schwefelsäure
4. Schwefelsäure	10. Essigsäure	4. Milchsäure.
5. Weinsäure	11. Buttersäure	
6. Zitronensäure	12. Valeriansäure.	

Die relative Wirkung der Säuren ist übrigens abhängig von der Natur der verdauten Eiweisskörper (Berg und Gries, Journ. of Biol. Chem. **2**, 489; 1907).

Man hat natürlich oft versucht, die beschleunigende Wirkung der Säuren mit ihrer Stärke (Affinitätskonstante, bezw. Dissoziationsgrad) in Beziehung zu setzen. Dass zwischen diesen beiden Grössen keine quantitativen Beziehungen, höchstens eine angenäherte Übereinstimmung der Reihenfolge gefunden werden konnte, liegt an der Komplikation der studierten Wirkung. Ein grosser Teil der Säure muss mit dem zu verdauenden Eiweiss zu Salzen zusammentreten, und es scheint, dass es gerade diese Salze sind, welche der peptischen Spaltung unterliegen. Die Hydrolyse des Eiweisssalzes, also z. B. Eiweisschlorides, muss um so kleiner, die Konzentration des Salzes bei gegebener Eiweissmenge um so grösser sein, je stärker die anwesende Säure ist. Da die Hydrolyse durch die allgemeine Gleichgewichtsbedingung

$$\underset{\text{Eiweiss}}{\gamma_2 C_2} \times \underset{\text{Säure}}{\gamma_3 C_3} = \underset{\text{Salz}}{\gamma_1 C_1} \times \underset{\text{Wasser}}{\gamma_4 C_4}$$

geregelt wird, wo also

γ_2	und	C_2	Dissoziationsgrad	und	Konzentration	des Eiweisskörpers,
γ_3	„	C_3	„	„	„	der Säure
γ_1	„	C_1	„	„	„	des Salzes
γ_4	„	C_4	„	„	„	des Wassers

bedeuten, so wird sofort ersichtlich, von welchen Grössen und in welcher Weise die Geschwindigkeit der Pepsinverdauung abhängig wäre, wenn ausschliesslich die Konzentration des Eiweisssalzes bestimmend wäre. Nun kommt aber zunächst noch die Einwirkung der Säure auf das Enzymmolekül in Betracht; sie führt dasselbe aus dem inaktiven (Zymogen-)Zustand in den aktiven über, und bleibt vermutlich während des ganzen Verlaufes der Verdauung mit dem Enzym verbunden.

Besonders auffallend ist in obiger Reihenfolge die geringe Wirksamkeit der Schwefelsäure; dieselbe ist vielleicht dem schädigenden Einfluss zuzuschreiben, welchen nach Grützner (Pfleiderer, Pflüg. Arch. **66**) speziell Sulfate auch in sehr kleinen Mengen ausüben. Andererseits ist die von

Wroblewski und anderen nachgewiesene, besonders stark aktivierende Wirkung der Oxalsäure hervorzuheben. Die von Sjöquist gefundene Stellung der Phosphorsäure hängt vielleicht mit der vielfach konstatierten aktivierenden Wirkung der Phosphate zusammen.

Über den Einfluss der Konzentration der Wasserstoffionen auf die Verdauungsgeschwindigkeit hat Sörensen eingehende Versuche angestellt, über welche im Kap. IV berichtet wird. Aus diesen scheint hervorzugehen, dass Lösungen, welche etwa 0,06 normal an Wasserstoffionen sind, die optimale Wirkung aufweisen.

Die Konzentration der freien Salzsäure des Magensaftes wurde bereits 1889 von F. A. Hoffmann (Zbl. f. klin. Med. **11**; 1891) mit der physikalisch-chemischen Inversionsmethode gemessen. Indessen können gegen die Anwendbarkeit dieser Methode zu solchen Bestimmungen Einwände erhoben werden. Vergl. Sörensen, Biochem. Z. **21**, S. 144.

Was die quantitativen Bestimmungen des Einflusses von Säuren und Basen angeht, so ist es unzweifelhaft am richtigsten, die Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Konzentration der Wasserstoffionen in der Lösung zu suchen. Die Messung der $H^{\cdot}$-Konzentrationen geschieht, wie Sörensen dies ausführlich darlegt, am besten elektrometrisch oder kolorimetrisch mittelst Indikatoren.

Ob die Aktivierung des Zymogens durch Säuren ein Vorgang ist, welcher sich von der Beschleunigung des einmal aktivierten Enzyms unterscheidet, ist noch nicht genügend festgestellt. Soweit die Erfahrungen des Verf. reichen, ist dies nicht der Fall, und wir werden im folgenden diese beiden Effekte auch nicht getrennt behandeln.

Schon Green (Proc. Roy. Soc. **48**) nahm an, dass zur Aktivierung des pflanzlichen Lipase-Zymogens Säuren erforderlich sind. Aber auch die spätere Lipolyse ist an die Anwesenheit von verdünnter Säure gebunden.

Hoyer (Chem. Ber. **37**, 1436; 1900) fasst seine Ergebnisse über den Einfluss von Säuren auf die Fettspaltung durch Ricinuslipase dahin zusammen, dass für eine bestimmte Fett- bezw. Fermentmenge eine bestimmte absolute Menge Säure zur Erzielung eines optimalen Spaltungseffektes notwendig ist; hierbei erwiesen sich Schwefel-, Oxal-, Ameisen-, Essig- und Buttersäure in annähernd gleicher Weise zur Auslösung der Enzymwirkung befähigt. Auch Armstrong und Ormerod, deren Versuchszahlen im folgenden Kapitel wiedergegeben sind, finden keinen Zusammenhang zwischen der aktivierenden Wirkung verschiedener Säuren und ihrer Dissoziationskonstante.

Hoyer zieht aus dem Umstand, dass zur Erzielung des Spaltungsoptimums bei gleicher Samenmenge eine bestimmte Mindestmenge einer Säure notwendig ist, den Schluss, dass während der Fettspaltung die Säure mit dem Samen in chemische Wechselwirkung tritt.

Über die Säure- und Alkaliempfindlichkeit der Magenlipase hat Volhard (Zeitschr. klin. Med. **42** u. **43**; 1901) interessante Versuche angestellt. Magensaft spaltet Fett in neutralen und sauren Lösungen; erst in 0,1 norm. HCl wird die Fettspaltung deutlich vermindert; dieser Saft ist andererseits ausserordentlich empfindlich gegen minimale Mengen NaOH. Dagegen ist der Glycerinextrakt recht empfindlich gegen HCl und viel resistenter gegen Alkali. Es lässt sich hieraus schliessen, dass die Magenschleimhaut ein Lipasogen enthält, das sich in seinem Verhalten gegen Säuren und Alkalien von der Magenlipase selbst, dem sog. Steapsin, unterscheidet.

Malzdiastase soll nur durch äusserst geringe Mengen schwacher Säuren gefördert werden. Konzentrationen von 0,001 % HCl schädigen bereits (Effront, Cole).

Pankreasdiastase soll zur Optimalwirkung etwas höhere $H^{\cdot}$-Konzentration erfordern, etwa 0,001 norm.

Ptyalin ist bezüglich seines Verhaltens in saurer und alkalischer Lösung zuerst von Hammarsten und dann noch oft und mit wechselndem Resultat untersucht worden (Chittenden, Langley). Es ist wirksam in schwach alkalischer, besser in neutraler Lösung, und noch besser wirkt dialysiertes Ptyalin auf dialysierte Stärke in äusserst schwach saurer Lösung (Cole, Journ. of Physiol. **30**, 202 u. 281; 1903). Salzsäure schadet aber schon von der Konzentration von 0,001 % an. Der Mundspeichel ist nach elektrometrischen Messungen von Foà nahezu neutral.

Ebenso zeigt Inulinase das Optimum ihrer Wirkung bei äusserst schwach saurer Reaktion (0,0001 norm. HCl). Bereits 1,5 %ige Sodalösung soll das Enzym vollständig zerstören (Bourquelot).

Über die optimale Acidität des Invertins sind wir sehr eingehend unterrichtet. Abgesehen von den älteren Versuchen von O'Sullivan und Tompson und von Cole liegen zwei gründliche neue Versuchsserien vor, nämlich von Hudson und von Sörensen.

Der Arbeit von Hudson entnehmen wir die folgende Kurve; sie gibt die Gesamtkonzentration der in der Lösung befindlichen Salzsäure an, also der freien und der (an Eiweiss) gebundenen.

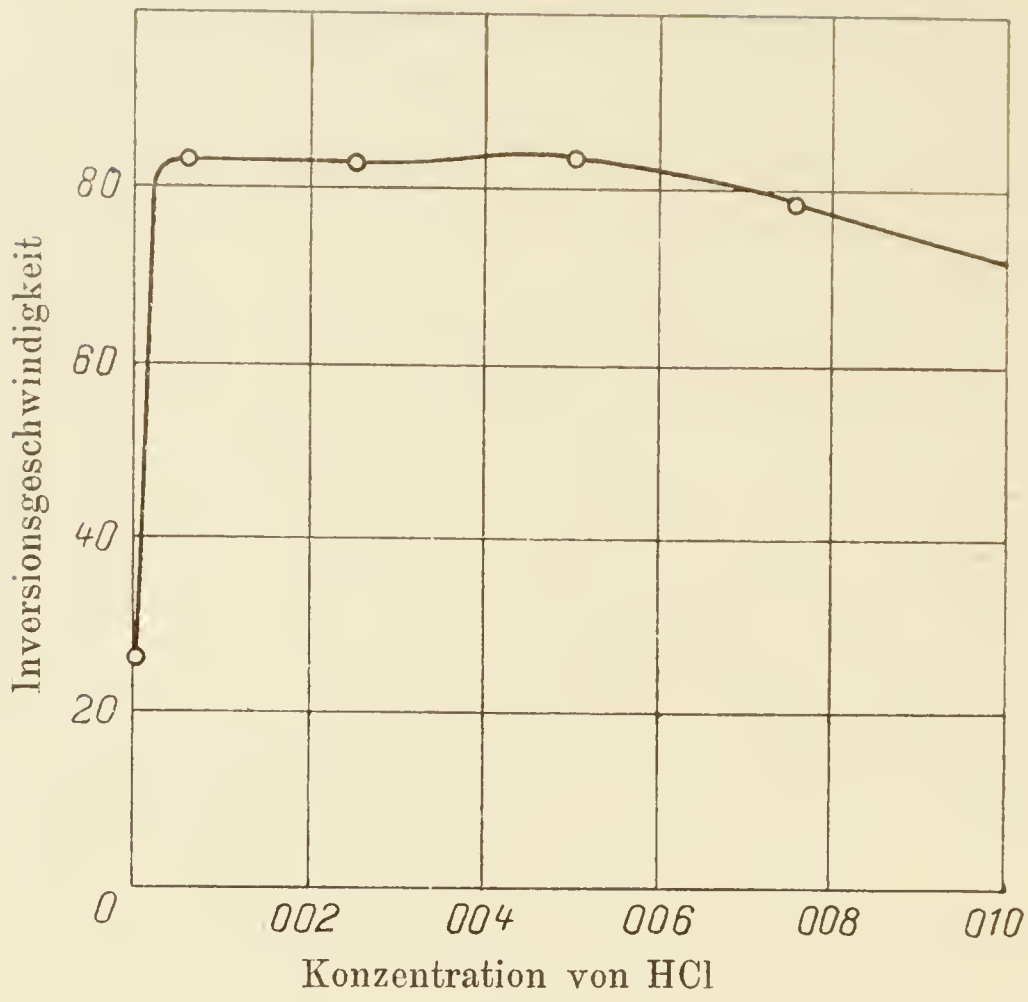


Fig. 2.

Wie dann Sörensen (Biochem. Z. **21**) gefunden hat, ist die optimale Schwefelsäuremenge für verschiedene Invertaselösungen weit verschieden, und wie zu erwarten ist, wachsend mit dem Stickstoffgehalt der Enzymlösung; die gleiche Abhängigkeit würde man natürlich an anderen starken Säuren finden. Dagegen wurde die optimale Konzentration der freien Wasserstoffionen, unabhängig von dem Gehalt der Invertaselösung an Eiweisskörpern u. dergl., in allen Versuchsreihen übereinstimmend zu 0,00003 gefunden ($p_H = 4{,}4 - 4{,}6$). Die Lage des Optimums ersieht man aus der Fig. 3. Die drei Versuchsreihen beziehen sich auf Schwefelsäurezusätze.

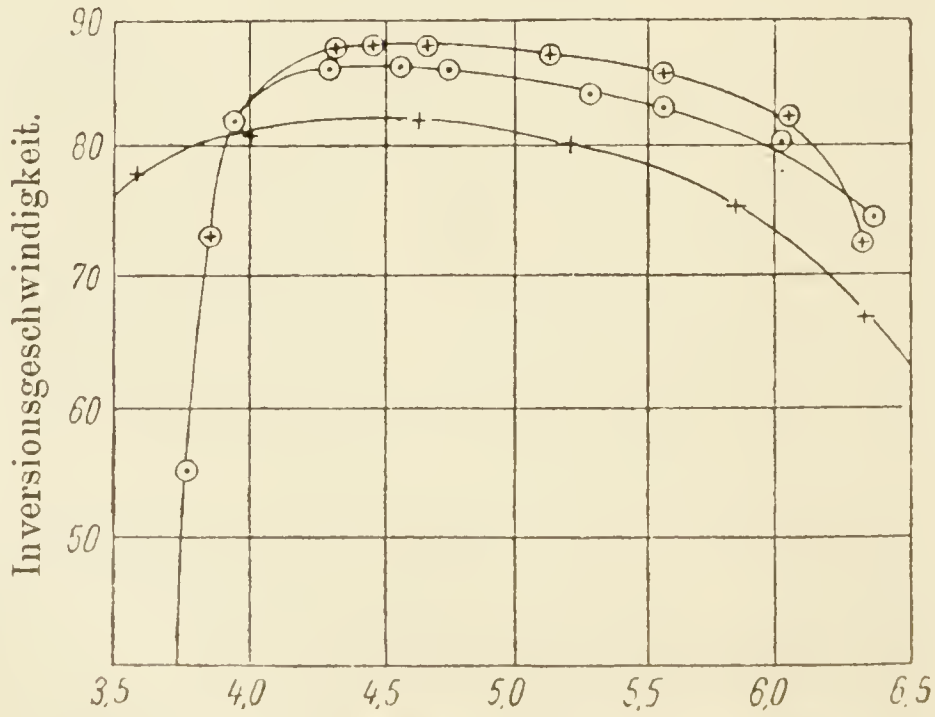


Fig. 3.

Laktase. Optimalwirkung nach Bierry und Salazar (C. r. **139**) bei einer HCl-Konzentration von 0,001 norm.; dagegen schädigt bereits 0,01 norm.

Pektinase (die Bertrandsche Pektase) wird schon in 0,1%iger Salzsäurelösung ganz gehemmt.

Von den proteolytischen Enzymen sind es, wie erwähnt, besonders diejenigen der Pflanzen, welche ihr Optimum in schwach saurer Wirkung zeigen. Das gilt z. B. nach Weis (H. **31**) und Lintner (Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **25**, 1902) für das Enzym des Malzes; nach Vines (Ann. of Bot. **11—19**) für zahlreiche erepsinhaltige Pflanzenextrakte und Hefeextrakt. Auch die Autolyse der Keimpflanzensubstanz verläuft am besten in saurer Lösung (Butkewitsch).

Emulsin zeigt das Optimum seiner Wirkung in neutraler Lösung, wie Auld neuerdings durch exakte Versuche gezeigt hat (Journ. chem. Soc. **93**).

Das Papain soll älteren Angaben zufolge in neutraler Lösung am besten wirken; es wird durch Alkalien geschwächt, und zwar reversibel; HCl hebt die schwächende Wirkung auf (H. **51**).

Aber auch der Tierkörper enthält ausser dem Pepsin noch proteolytische Enzyme, welche ihre Tätigkeit in saurer Lösung entfalten. Hier sind zunächst die von Hedin und Rowland (H. **32**) entdeckten proteolytischen Enzyme der Lymphdrüsen, der Nieren und der Milz zu erwähnen, welche durch Alkali gehemmt werden.

Zahlreiche Arbeiten über die Fermente der Autolyse stimmen darin überein, dass die Autolyse in saurer Lösung überhaupt erst einsetzt oder wenigstens viel schneller verläuft, als bei schwach alkalischer Reaktion (Schwiening, Virch. Arch. **136**; Hildebrand, Hofm. Beitr. **5**; v. Drjewezki, Biochem. Z. **1**, 299; 1906). Eine eingehende Studie über den Einfluss von Säuren und Alkalien auf die Autolyse verdankt man Hedin.

Borsäure und Salicylsäure wirken innerhalb gewisser Konzentrationen beschleunigend auf die Autolyse der Leber in Vergleich zu Chloroformwasser. Vom Gesamtstickstoff gehen nämlich nach Yoshimoto (H. **58**) bei optimalen Konzentrationen in Lösung:

in Chloroformwasser	21,6 %
„ 1%iger Borsäurelösung	40,8 %
„ halbgesättigter Salicylsäurelösung	47,4 %

Zu ähnlichen Resultaten kam auch Kikkoji (H. **63**).

Nicht ganz so empfindlich, wie der Magensaft gegen Alkalien sind der Pankreas- und der Darmsaft, welche vorzugsweise bei neutraler bis alkalischer Reaktion wirken, gegen Säuren. Reines Trypsin wird in wässeriger Lösung allerdings schon durch die H-Normalität 0,01 unwirksam; in Gegenwart des Substrates aber ist die Empfindlichkeit geringer, und 0,02%ige

Milchsäure soll sogar die Trypsinverdauung beschleunigen (Lindberger). Trypsin und Erepsin spalten Eiweisskörper also nicht nur in alkalischer bezw. neutraler, sondern in gewissen Fällen auch in sehr schwach saurer Lösung. Aber schon freie Kohlensäure verzögert die Verdauung. Auch beim Trypsin haben sich Ungleichheiten in dieser Hinsicht je nach der Herkunft ergeben; dieselben haben Pollack zur Annahme eines besonderen Enzyms, der Glutinase geführt (Hofm. Beitr. **6**).

Wie das Optimum der Säurewirkung durch die Konzentration der in Lösung befindlichen Wasserstoffionen angegeben ist, so handelt es sich bei der alkalischen Reaktion um die Konzentration der freien Hydroxylionen. Kanitz (H. **37**) hat aus Versuchen von Dietze (Diss. Leipzig 1900) berechnet, dass die tryptische Verdauung am schnellsten verläuft, wenn die Lösung $^1/_{70}$—$^1/_{200}$ normal in bezug auf Hydroxylionen ist.

Indessen sind diese Werte, welche für die Fibrinverdauung gefunden sind, nicht ohne weiteres auf alle Trypsinwirkungen zu übertragen.

Nach Kudo (Biochem. Z. **15**) wird die Trypsinverdauung schon durch eine Alkali-Konzentration von 0,0118 % = 0,003 norm. verzögert. Neben der reversibeln, verzögernden Wirkung besteht noch eine irreversible, welche das Trypsin zerstört.

Versuche über die Spaltungsgeschwindigkeit von Dipeptiden mittelst Pankreatin und Erepsin haben dem Verf. (H. **51**) sehr viel kleinere Werte ergeben. Bei Anwendung von Erepsin aus Schweinsdarm ergab sich ein ausgeprägtes Optimum der Alkalinität, wie folgende an Glycylglycin ausgeführte Messungen zeigen:

0,1 n-Glycylglycin. 5 g Erepsinpulver in 100 ccm.

Alkalikonzentration	0	0,04	0,05	0,075	0,10
Reaktionskonstante $k \times 1000$	$<$0,05	7,0	6,2	2,6	0,2

Bei Versuchen mit Erepsin aus keimenden Erbsen war das Optimum weniger scharf (Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **2**, Nr. **39**; 1907):

Alkalikonzentration	0	0,025	0,05	0,10
Reaktionskonstante $k \times 10000$	0,7	10,3	9,0	5,7

Berücksichtigt man die Salzbildung des Alkalis mit dem Glycylglycin, dessen Dissoziationskonstante als Säure $1{,}8 \times 10^{-8}$ beträgt, so führt die erste Tabelle zu der Optimalkonzentration der Hydroxylionen: 0,00002 norm. (Dabei ist die Bindung des Alkalis durch das Erepsin nicht berücksichtigt.)

Ähnliche Versuche haben dann auch Abderhalden und Koelker (H. **54**) angestellt, von welchen wir einige hier anführen (Serie B., Seite 380).

	a) 1,5 mol. NaOH	b) 1,0 mol. NaOH	c) ohne NaOH, als Kontrolle
	Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid		
	4,0 ccm 3/32 mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm 3/32 mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm 3/32 mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin
	0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft
	0,07 „ Darmsaft	0,07 „ Darmsaft	0,07 „ Darmsaft
	0,55 „ n-NaOH	0,37 „ n-NaOH	1,6 „ Wasser
	1,05 „ Wasser	1,23 „ Wasser	
Zeit Minuten	Abgelesene Winkel		
6	+ 0,80°	+ 0,73°	+ 0,59°
15	+ 0,81°	+ 0,75°	+ 0,57°
41	+ 0,80°	+ 0,64°	+ 0,48°
174	+ 0,76°	+ 0,60°	+ 0,40°
260	+ 0,73°	+ 0,51°	+ 0,38°
378	+ 0,58°	+ 0,43°	+ 0,23°
1428	+ 0,49°	+ 0,31°	+ 0,09°

Das Resultat ist, dass schon geringe Mengen von Alkali die Hydrolyse von Glycyl-l-tyrosin durch Pankreassaft + Darmsaft verzögern.

Zahlreiche Versuche über den Einfluss der Alkalinität auf Eiweiss- und Peptonspaltung durch Erepsin hat Vernon ausgeführt (Journ. of Physiol. **30**, 330; 1903). Er unterscheidet zwei Erepsine, Pankreas- und Darmerepsin. Beide werden durch 0,4—1,2%iges Na_2CO_3 beschleunigt, aber Darmerepsin wird gleichzeitig irreversibel zerstört.

Auch aus den Versuchen von Bayliss (Arch. d. Sciences Biol. **11**) an Kasein berechnet sich eine kleinere Optimalkonzentration des Alkalis, als aus Dietzes Versuchen mit Fibrin.

Über die Wirkungsweise des Alkalis bei der tryptischen Verdauung hat man noch keine feste Vorstellung. Im Verlauf der Reaktion muss freies Alkali verschwinden, da bei der Spaltung der Eiweissmoleküle zu Aminosäuren Carboxylgruppen frei werden. Man könnte dann erwarten, dass diese Verminderung der Hydroxylionen im zeitlichen Verlauf der Reaktion deutlich zum Ausdruck kommt. Es läge nahe, die Gültigkeit einer der Formeln zu erproben, welche für negative Autokatalysen gelten — Vorgänge, bei welchen der Katalysator durch die Reaktion selbst verbraucht wird. Indessen zeigt es sich, dass solche Formeln die Versuchszahlen nicht wiedergeben; vielmehr bleibt in den Untersuchungen von Taylor und Bayliss der Koeffizient k der theoretischen Formel

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$$

ziemlich konstant. T. B. Robertson und Schmidt (Journ. of Biol. Chem. **5**) haben neuerdings mit Hilfe einer Gaskette eingehender untersucht, nach welchem Gesetz die Hydroxylionen während der Verdauung abnehmen. Sie finden, dass sich diese Abnahme durch eine monomolekulare Formel dar-

stellen lässt, wenn die OH-Konzentration grösser ist als 10^{-6} und durch eine bimolekulare Formel, wenn die OH-Konzentration zwischen 10^{-6} und 10^{-7} liegt. Bindende Schlüsse über die Art der Teilnahme der OH-Ionen an der Verdauung haben sich auch aus den genannten Versuchen noch nicht ziehen lassen.

Chymosin wird durch Säuren aus dem Zymogenzustande in das aktive Stadium übergeführt (Hammarsten 1872), wobei sich für äquimolekulare Säuremengen folgende Reihenfolge ergibt: HCl, HNO_3, H_2SO_4, Milchsäure, Essigsäure, H_3PO_4 (Lörcher, Pflüg. Arch. **69**). Ist das Lab einmal aktiviert, so wirkt es auch in neutraler und alkalischer Lösung. Gerber hebt in zahlreichen, eingehenden Arbeiten (C. r. **146—148**) die Verschiedenheit der Labenzyme ungleicher Herstammung hervor.

Die pflanzlichen Labenzyme, die bei jeder Temperatur rohe Milch schwerer koagulieren als gekochte, werden durch kleine Mengen Alkali in ihrer Wirkung verzögert, durch grössere Säuremengen gefördert. Solche Labenzyme, welche nur bei höherer Temperatur rohe Milch schwerer angreifen, werden nur durch mehr als zweibasische Säuren gehemmt, durch zweibasische in ganz kleinen Dosen gehemmt, in grösseren gefördert, während alle anderen Säuren stets fördern. Solche Chymosine aber, welche die rohe Milch leichter koagulieren als die gekochte, werden durch alle Säuren gefördert.

Bei gewissen (calciphilen) pflanzlichen Labfermenten, z. B. aus dem Saft von Maclura aurantiaca, tritt eine Beschleunigung der Koagulierung der Milch ein, und zwar bei Anwendung von roher und gekochter Milch. Die Koagulierung der rohen Milch wird in Gegenwart der basiphilen Labfermente durch schwache Dosen von HCl nur wenig beschleunigt, durch mittlere Dosen der Säuren aber stark verzögert. Gekochte Milch wird durchgehends beschleunigt, aber viel weniger als durch die wirklich calciphilen Labfermente, wie Chymosin aus Kalbsmagen.

Die Konzentration der H·-Ionen in der Milch hat neuerdings van Dam (H. **58**) elektrometrisch zu $0{,}14 - 0{,}32 \times 10^{-6}$ bestimmt. Aus der gleichen Untersuchung zieht der Autor den Schluss, dass die Gerinnungszeit umgekehrt proportional der Konzentration der H·-Ionen ist.

Parachymosin soll nach Bang (Pflüg. Arch. **79**) Säuren gegenüber viel widerstandsfähiger sein als Chymosin, soll aber von Alkali viel leichter zerstört werden.

Sera von schwacher Thrombinwirkung werden sowohl durch Säuren als durch Alkalien aktiviert (Arch. f. klin. Med. **79** und **80**).

Zymasegärung wird durch Zusätze geringer Alkalimengen beschleunigt (Buchner und Rapp, Chem. Ber. **30**); schwache Säuren hemmen.

Die ausserordentliche Säureempfindlichkeit der Laccase, welche Bertrand quantitativ ermittelt hat, geht aus den im nächsten Kapitel mitgeteilten Zahlen hervor.

Auch Peroxydasen werden durch Säuren paralysiert, jedoch sind hierzu wesentlich grössere Mengen nötig als zur Hemmung der Laccase. Die Säuren paralysieren angenähert proportional mit ihrem Dissoziationsgrad (Bertrand und Rozenband, C. r. **148**).

Den Einfluss von Säuren und Alkalien auf Blutkatalase verschiedener Herkunft hat Jacobson (H. **16**) zuerst eingehend studiert. Verf. hat damit

das Verhalten der Katalase aus Fett und aus Boletus scaber verglichen (Hofm. Beitr. **7**).

Auch Senter (Zeitschr. physik. Chem. **44**) fand, dass Säuren eine sehr starke Verzögerung der Katalase hervorrufen, ohne dass das Enzym dadurch dauernd geschädigt wird. Die Dauer der Inkubationszeit — der Zeit, während welcher die Säure in Berührung mit dem Enzym steht, bevor das Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt wird — übt nämlich auf die Reaktion keinen wesentlichen Einfluss aus. Dass schon sehr kleine Säurekonzentrationen wirksam sind, zeigen folgende Zahlen:

Konzentration:	Konstante:
$^1/_{10000}$ norm. HCl	0,0011
$^1/_{20000}$ „ „	0,0075
$^1/_{\infty}$ „ „	0,0100

Bei HCl und HNO_3 ändert sich nach Senter die hemmende Wirkung ungefähr proportional der dritten Potenz der Säurekonzentration. Nach Faitelowitz ist jedoch die „Vergiftung“ der Milchkatalase durch Salzsäure der Konzentration der letzteren annähernd einfach proportional.

Im Anschluss an die Wirkung der Säuren und Basen ist noch diejenige der sauren Salze zu erwähnen, unter welchen besonders die sauren Phosphate, Karbonate, Citrate usw. in Betracht kommen. Auch hier sind in den meisten Fällen die Wasserstoffionen der wirksame Bestandteil. Saure Salze bezw. Mischungen von neutralen Salzen und den entsprechenden (schwachen) Säuren halten die Konzentration der Wasserstoffionen bei enzymatischen Reaktionen innerhalb ziemlich enger Grenzen konstant, indem in ihrer Anwesenheit Zusätze kleiner Mengen von Säuren oder Basen das Ionengleichgewicht in der Lösung nur wenig verändern können. Man bezeichnet solche sauren Salze oder Salzgemische anschaulich als Puffer. In analoger Weise wie saure Salze fungieren, wie leicht verständlich, Aminosäuren als Puffer.

Aktivierung durch Salze. Einen auffallend kräftigen aktivierenden und beschleunigenden Einfluss üben die Ca- und Mg-Salze auf die Trypsinverdauung aus; hierauf haben Delezenne und E. Zunz (Soc. Biol. **59**, 477; 1906 und **60**, 1070; 1906) aufmerksam gemacht.

(Der schädigende Einfluss von $CaCl_2$, welchen Malfitano (C. r. **141**) bei Milzbrandprotease gefunden hat, beruht vielleicht darauf, dass das Optimum der Ca-Konzentration weit überschritten war.)

Pawlow sowie Bayliss und Starling (Journ. of Physiol. **32**, 129; 1905) und E. Zunz nehmen an, dass es sich bei der Umwandlung des Proenzyms durch Kinasen und mit Calciumsalzen um eine katalytische Reaktion handelt. E. Zunz hat für seine Ansicht folgende Versuche angeführt;

Nachdem inaktiver Pankreassaft während 10—12 Stunden im Brutofen mit $CaCl_2$ oder $Ca(NO_3)_2$ gestanden hat und das Calcium durch Ammoniumoxalat gefällt worden war, wirkte der Saft proteolytisch. Dagegen hatte derselbe sich unter den gleichen Bedingungen unter dem Einflusse der Kalksalze in 1—2 Stunden noch nicht aktiviert. Analoge Ergebnisse wurden mit Magnesiumsalzen erhalten.

Natrium, Kalium, Ammonium, Zink, Beryllium, Aluminium, Kobalt, Nickel, Eisen, Mangan, Uran und Kupfer waren, in Form löslicher Salze zugesetzt, unwirksam. Die Wirkung der Salze von Cäsium, Rubidium und Lithium erwies sich unregelmässig. Wegen der zahlreichen Einzelheiten, welche Zunz bezüglich der Aktivierung des Pankreassaftes festgestellt hat, sei auf die eingehenden Monographien dieses Forschers „Recherches sur l'activation du suc pancréatique" (Brüssel 1906—1907) verwiesen.

α-Prothrombin wird durch Kalksalze in Thrombin verwandelt (Morawitz, Hofm. Beitr. **4** u. **5**). Auch die Pektinase, das pflanzliche koagulierende Ferment, welches Pektin in Pektinsäure überführt, soll erst in Gegenwart von Ca, welches hier durch Sr und Ba ersetzt werden kann, seine Wirkung entfalten. (Bertrand und Mallèvre, C. r. **119—121**; 1894—1895.)

Da ferner ausser Trypsin auch noch Erepsin (Abderhalden, H. **59**) und Pankreaslipase durch $CaCl_2$ beschleunigt wird (Pottevin, C. r. **136**; Kanitz, H. **46**), so kann nicht mehr behauptet werden, dass Ca ein streng spezifischer Aktivator ist. Zweifellos steht jedoch fest, dass Calcium sich in den genannten Fällen nicht etwa durch die Alkalimetalle ersetzen lässt.

Dass hiermit die bekannten Entdeckungen von Jacques Loeb (Vorles. über die Dynamik der Lebenserscheinungen, Leipzig 1906) über die spezifische Wirkung von Kalksalzen in Zusammenhang stehen, wird kaum bezweifelt werden können.

Andererseits kennen wir auch rein chemische Reaktionen, in welchen Ca als spezifischer Katalysator wirkt. So hat O. Loew (Chem. Ber. **21**) gefunden, dass Kalk ein besonders geeignetes Mittel ist, um Formaldehyd zu Zucker zu kondensieren. Das gleiche hat Verf. für die Formiatbildung festgestellt (Chem. Ber. **38**, 2551; 1905).

Eine ähnliche spezifische Wirkung wie Calcium scheint auch in gewissen Fällen das Magnesium auszuüben. Auf die wichtige Rolle des Magnesiums für das Pflanzenleben hat übrigens Willstätter (Lieb. Ann. **350**; 1906) in einer interessanten Arbeit hingewiesen.

Zu den als Aktivatoren biologisch wichtigen Metallen gehört ferner das Mangan. Wie zuerst durch Bertrand festgestellt wurde, ist Mangan ein wesentlicher Bestandteil der Oxydasen. Es kommt daselbst gemeinschaftlich mit Oxysäuren vor, und ist in den Oxydasen an diese komplex gebunden. Da Mangan auch sonst als kräftiger Oxydationskatalysator bekannt ist, kann man seine Rolle in Oxydasen chemisch wohl verstehen.

In Zusammenhang hiermit steht auch wohl die günstige Wirkung, welche Mangansalze auf die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch Katalasen ausüben.

Auffallender ist, dass Mangansalze auch enzymatische Hydrolysen beschleunigen. So wird, wie Hoyer (Chem. Zbl. 1905, II, 582) gefunden hat, die Fettspaltung durch pflanzliche Lipasen durch geringe Mengen Mangansulfat gefördert, und auch diastatische Enzyme des Serums und Pankreassaftes werden, wie A. Gigon und T. Rosenberg (Skand. Arch. f. Physiol. **20**) gefunden haben, durch das gleiche Salz — sogar in der Verdünnung von $^1/_{1000}\,^0/_0$ — energisch aktiviert.

Eisensalze sind als allgemeine rein chemische Oxydationskatalysatoren bekannt; wie sie die Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds durch kolloides Platin beschleunigen, so verstärken sie auch die Katalasen, sowohl für sich, als besonders in Gemeinschaft mit Mangansalzen. Auch die Wirkung der Tyrosinasen sollen sie spezifisch befördern (Durham, Proc. Roy. Soc. **74**). Ob die zweifellos hervorragende Rolle der Eisensalze in Organismen in einer Zusammenwirkung mit Enzymen besteht oder vorzugsweise selbständig ist, lässt sich noch nicht entscheiden.

Hier mag erwähnt werden, dass Wasserstoffsuperoxyd die Wirkung der Verdauungsenzyme verstärkt (Vandevelde, Hofm. Beitr. **5**).

Zu den bemerkenswertesten anorganischen Aktivatoren gehören die Alkaliphosphate. Abgesehen von der Wirkung der primären und sekundären Phosphate als „Puffer“ üben die Phosphate einen starken, spezifischen Einfluss auf einzelne Enzymreaktionen aus. Vor allem ist hier die Zymasegärung zu erwähnen, welche, wie an anderer Stelle erörtert ist, ein Phosphat zur Entfaltung der Wirksamkeit bedarf. Ferner beschleunigen die Monophosphate des Ammoniums und Calciums die diastatische Spaltung (Effront), und für die Wirksamkeit des Ptyalins sollen nach Roger (Soc. Biol. **65**) Phosphate unbedingt nötig sein. Damit hängt vielleicht auch die folgende Beobachtung Rogers (Soc. Biol. **62**) zusammen:

Menschlicher Speichel wird durch 10—15 Minuten langes Erhitzen auf 85—100° inaktiviert. Setzt man zu der erhitzten Lösung eine kleine Menge frischen Speichels, so verzuckert dieselbe viel stärker als die zugesetzte Speichelmenge allein.

Auch die Labwirkung wird durch geringe Mengen Mononatriumphosphat beschleunigt (Gerber, Soc. Biol. **64**), wobei vielleicht die Änderung der Acidität durch diesen Salzzusatz diese Wirkung bedingt. Das gleiche gilt möglicherweise für die Aktivierung der Laccase durch Na_2HPO_4 bei gewissen Oxydationen (J. Wolff, C. r. **149**, 467; 1909).

Im Anschluss an diese Beschleunigung durch Phosphorsäure ist zu erwähnen, dass Chittenden eine günstige Wirkung der arsenigen Säure

auf die peptische Verdauung konstatiert hat. Auch die Autolyse wird nach Izar durch As zuweilen beschleunigt.

Alkalisalze. Was schliesslich die Salze der Alkalien betrifft, so wirken dieselben teils befördernd, teils hemmend.

Das meist untersuchte Salz ist Natriumchlorid. Es befördert zwar die Wirkung von Diastase, Maltase, Ptyalin nach Osborne, Bierry und Schäffer (Soc. Biol. **62**, 723; 1907), Cole (Journ. of Physiol. **30**), Wohlgemuth (Biochem. Z. **9**). Die weit grössere Zahl der Enzyme, so das Invertin, Pepsin, Trypsin, die Zymasen und Katalasen (vergl. hierzu z. B. Lockemann, Thies und Wichern, H. **58**), wird jedoch von NaCl gehemmt.

Amylase wird durch kleine Mengen der Chloride, Nitrate, Sulfate, Phosphate, Vanadate und Alaune der Alkalien oft in hohem Grad begünstigt (Lintner, J. prakt. Chem. [2] **36**. — Effront, C. r. **115**. — Grüss.) Ptyalin wird durch KJ ein wenig gefördert (Neilson und Terry, Amer. Journ. Physiol. **22**).

Cole ist zum Resultat gekommen, dass Anionen die Amylase begünstigen, Kationen schwächen, und zwar soll der Effekt um so grösser sein, je grösser die Elektroaffinität (diese Grösse meint Cole offenbar mit dem etwas unbestimmten Ausdruck: actinising power) der Ionen ist.

Die amylolytische Wirkung des Pankreatins wird nach Preti (Biochem. Z. **4**) ebenfalls durch viele Salze gefördert, wenn sie in verdünnter Lösung zugesetzt werden.

Störend wirken hingegen auf Amylase Chlorcalcium und Chlorbaryum sowie grössere Zusätze der Sulfate, Phosphate und Alaune der Alkalien.

Nach F. Krüger verzögern NaCl, KCl, NH_4Cl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ in äquivalenten Mengen in gleicher Weise. Man kann daraus den Schluss ziehen, dass der hemmende Einfluss des Anions der überwiegende ist. Dies erinnert an die übereinstimmenden Resultate von J. Schütz (Hofm. Beitr. **5**) und Levites (H. **48**), dass die peptische Verdauung hauptsächlich durch Anionen stark geschwächt wird.

Nach Kudo wird die verdauende Wirkung des Pankreatins durch Alkalisalze im allgemeinen verzögert: durch NaCl etwas mehr als durch $NaNO_3$ und $NaNO_2$. Kaliumsalze hemmen nach diesem Autor weniger als Natriumsalze.

Natriumsulfat und Kaliumsulfat hemmen die Labwirkung des tierischen Chymosins proportional ihrer Menge (wenn die labende Kraft durch die Koagulierbarkeit roher Milch gemessen wird), während pflanzliches Lab in seiner koagulierenden Wirkung durch kleine Dosen unterstützt, durch grössere gehemmt wird.

Dieses verschiedene Verhalten des pflanzlichen und des tierischen Labs gegenüber neutralen Sulfaten erklärt Gerber, wie dasjenige der Salze

PO_4Na_2H und PO_4K_2H durch die von den Salzen verursachte Fällung von Kalk, der bei der pflanzlichen Labgerinnung weniger nötig ist, als bei der tierischen. — Durch geringe Mengen saurer Sulfate wie SO_4KH wird sowohl die pflanzliche wie die tierische Labwirkung beschleunigt.

Allgemein lässt sich über die Wirkung von Aktivatoren etwa folgendes sagen:

Was die „Kinase" des Trypsins betrifft, so wurde dieselbe einerseits als Katalysator der Reaktion Trypsinogen-Trypsin aufgefasst, andererseits kann sie den aktivierenden Säuren an die Seite gestellt werden.

Es wäre nun in erster Linie wünschenswert durch eine grössere Reihe von Versuchen zunächst zu erfahren, ob die Überführung von Proenzym in Enzym ein reversibler Vorgang ist.

Es bleibt dann noch die Möglichkeit einer chemischen Reaktion zwischen Zymogen und Kinase, und um Anhaltspunkte über diese zu gewinnen, wäre dann zweitens der zeitliche Verlauf der Aktivierung näher zu studieren. Dass der Vorgang relativ schnell verläuft, wissen wir schon aus den Untersuchungen Pawlows und seiner Mitarbeiter.

Oft wird in der einen oder anderen Weise das Zymogen „spontan" aktiviert. In den meisten Fällen wird es sich darum handeln, dass das Substrat oder eine diesem folgende fremde Substanz durch irgend eine langsam verlaufende Reaktion den Aktivator liefert. Hoyer hat in einer interessanten Untersuchung (l. c.) Milchsäure als derartig aktivierende Substanz auftreten sehen. Ist der Aktivator unter den gegebenen Verhältnissen ein normales Reaktionsprodukt des Substrates, so haben wir den wohlbekannten Fall der Autokatalyse vor uns. Das typische Beispiel eines solchen Reaktionsverlaufes ist der freiwillige Zerfall des Äthylacetates in wässeriger Lösung. Hier ist die freiwerdende Essigsäure der Katalysator, welcher die weitere Hydrolyse proportional mit der Konzentration seiner Wasserstoffionen beschleunigt.

Einstweilen haben wir wohl keinen Grund, zwischen der die Reaktion einleitenden Aktivierung der Zymogene und der übrigen reaktionsbeschleunigenden Wirkung der Säuren, Alkalien und vieler Salze prinzipiell zu unterscheiden.

Die Wirkung dieser letzteren, oft als Ko-Enzyme bezeichneten Stoffe beruht aber zweifellos auf der Bildung reversibler Verbindungen dieser Aktivatoren teils mit dem Substrat, teils mit den Enzymen. In den meisten Fällen wird es sich um eine Salzbildung handeln (Euler, Hofm. Beitr. **7**); dieselbe erfolgt momentan, und deswegen sind auch die „Inkubationszeiten" der beschleunigenden Alkalien, z. B. bei der Katalase, ebenso wie die hemmenden Säuren ohne Einfluss; natürlich nur solange störende Nebenreaktionen, welche chemisch Enzym oder Substrat zersetzen, vermieden werden.

In manchen Fällen dürfte die minimale Konzentration, welche das Optimum der Säure- bezw. Alkaliwirkung bestimmt, gerade der zur Neutralisation der Lösung erforderlichen Säure- und Alkalimengen entsprechen. (Vergl. auch Cole, Journ. of Physiol. **30**, 202; 1903.)

Die Empfindlichkeit der Enzyme, Säuren und Alkalien gegenüber ist zwar sehr hoch, aber wohl zu verstehen, wenn man die sehr geringen Konzentrationen berücksichtigt, in welchen die Enzyme selbst in der Lösung vorhanden sind. Wir finden bei vielen bekannteren katalytischen Vorgängen mehr oder weniger vollkommene Analogien: Eine Hydrochinonlösung enthält 0,001 normales Mangansulfat, ihre Oxydationsgeschwindigkeit ist gering. Nun setzt man die äquivalente minimale Quantität Alkali zu, welche hinreicht, um den grössten Teil der Schwefelsäure zu binden, das Manganhydroxyd in Freiheit zu setzen und dadurch die Reaktion ausserordentlich zu beschleunigen. Das Mangansulfat entspricht dem Enzym im inaktiven Zustand, das Alkali dem Aktivator. Der chemische Vorgang bei Hydrolysen besteht vermutlich darin, dass die aktivierende Säure, z. B. bei der enzymatischen Inversion des Rohrzuckers, die in neutraler Lösung als Salz anwesende Invertase in Freiheit setzt und so den aktiven Zustand des Enzyms herbeiführt. Vergl. Euler u. B. af Ugglas (H. **65**).

Ausser der Salzbildung müssen wir dem Zustandekommen komplexer Verbindungen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Enzyme zuschreiben. In dieser Weise machen sich wohl die spezifischen Eigenschaften sowohl der Phosphorsäure als auch des Calciums und Mangans geltend, über welche oben berichtet wurde. Beim Mangan ist die Fähigkeit, komplexe Verbindungen mit hydroxylhaltigen Körpern einzugehen, schon lange bekannt; weniger beim Calcium, wo indessen auch physikalisch-chemische Untersuchungen die Annahme von Komplexen notwendig gemacht haben. Die Reaktionsfähigkeit der Phosphorsäure mehrwertigen Alkoholen gegenüber ist qualitativ vielfach festgestellt; quantitative Versuche wären wohl auch in biologischer Hinsicht von Interesse.

Bereits bei der Besprechung der Pepsinwirkung auf Seite 67 ist darauf hingewiesen worden, dass die Salzsäure nicht nur auf das Enzym einwirkt, sondern auch durch die Salzbildung mit den Eiweisskörpern die Verdauung beschleunigt. Analog sind es wohl die Alkalisalze der Peptone und Peptide, welche die aktiven Moleküle der tryptischen Verdauung ausmachen. Rein chemische Analogien dafür, dass die Reaktionsfähigkeit einer Substanz sich bei der Salzbildung vollständig ändert, lassen sich in beliebiger Zahl angeben: Salpetrige Säure diazotiert, Nitrite tun das nicht; Polyphenole werden durch den Sauerstoff der Luft in alkalischer Lösung sehr leicht, in saurer sehr schwer oxydiert. Die Zersetzungsgeschwindigkeit des Wasserstoffsuperoxyds ist von den anwesenden Säuren oder Alkalien in ganz analoger

Weise abhängig, sei es, dass diese Reaktion von „Katalasen" oder von anorganischen Oxyden (kolloidales Platin, Ferrihydroxyd) hervorgerufen wird.

Durch ihre Fähigkeit, als amphotere Elektrolyte sowohl mit Säuren als Alkalien Salze zu bilden, wirken indirekt Eiweissstoffe, Peptone und Aminosäuren oft beschleunigend, wenn auch selten besonders kräftig; sie regulieren, wie Verf. bereits in einem Referat betont hat (Ergebn. d. Physiol. **6**) gewissermassen die Konzentration der freien Säuren und Basen [1]).

Schliesslich wäre noch der Fälle zu gedenken, in welchen der Aktivator das gemeinsame Lösungsmittel, also das Bindeglied für Enzym und Substrat liefert, wenn beide an und für sich kein homogenes System bilden können. Vielleicht findet die oben erwähnte Aktivierung der Lipasen durch Gallensäuren in dieser Weise ihre Erklärung. Die rein chemische (nicht enzymatische) Fettspaltung durch Naphtalinstearosulfonsäure ist bereits von Twitchel in dieser Weise gedeutet worden.

Auch bei den Neutralsalzwirkungen sind die zugrunde liegenden Ursachen recht verschieden.

Zum Teil sind es einfache chemische Umsetzungen zwischen den anwesenden Elektrolyten und dadurch verursachte Änderungen der Azidität oder Alkalinität. Daher schädigt z. B. Natriumsulfat, Natriumsalicylat und phosphorsaures Natrium die Pepsinverdauung (Pawlow, Danilewski); hier wird die starke Salzsäure durch die schwächeren, weniger wirksamen Säuren dieser Salze ersetzt. Bei stärkeren Salzkonzentrationen kommt dann noch die Dissoziationsbeeinflussung in Betracht, wodurch etwa Natriumchlorid die elektrolytische Dissoziation der Eiweisschloride zurückdrängt. Ferner machen sich hier dieselben Einflüsse geltend, welche auch bei nicht enzymatischen Hydrolysen die „Neutralsalzwirkung" hervorrufen, welche übrigens auch hier bei verschiedenen Reaktionen recht verschieden ist.

Die Wirkungen geringer Mengen von Neutralsalzen, wie NaCl, KCl u. a. würden wohl nicht selten zutage treten, wenn die Salzzusätze zu von vornherein elektrolytfreien Enzymlösungen erfolgte. Wenigstens deuten viele Versuche darauf hin, dass gerade die kleinen Salzmengen, welche die Enzyme in den Organen begleiten, wesentlich für ihre Tätigkeit sind.

Sehr grosse Salzzusätze wirken koagulierend und fällen aus den meistens kolloide Stoffe enthaltenden Enzymlösungen, mehr oder weniger direkt das Enzym aus. Jedoch bleiben selbst hohe Salzkonzentrationen manchmal ohne schädigende Wirkung, wie z. B. Ptyalinlösungen auch durch viel $MgSO_4$

---

[1]) In manchen Fällen verhindern Eiweisskörper, welche Enzymlösungen zugesetzt werden, die schädliche Einwirkung tryptischer Fermente auf die Enzyme. Indessen sind auch noch anderweitige günstige Wirkungen beobachtet, z. B. bei der Diastase, beim Ptyalin u. a.

und $(NH_4)_2SO_4$ nicht geschwächt werden (Patten und Stiles, Amer. Journ. of Physiol. **17**)[1]).

Neben dem reversibeln Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Enzymreaktionen üben Säuren, Alkalien und Salze noch einen Einfluss auf die irreversibeln Veränderungen der Enzymsubstanz aus. Die beiden Wirkungen unterscheiden sich wesentlich. Letztere ist z. B. am Invertin von Fernbach studiert worden (Recherches sur la sucrase. Thèse, Paris 1890). Dieser Forscher fand, dass gelöstes Invertin, dem Luftsauerstoff ausgesetzt, sich allmählich oxydiert und dadurch dauernd unwirksam wird. Diese Oxydation erfolgt viel rascher in alkalischer, als in saurer Lösung.

Schutzstoffe.

Endlich machen sich, und zwar nicht ganz selten, Neutralsalzwirkungen bei Enzymreaktionen in indirekter Weise geltend; ihr günstiger Einfluss beruht auf der Zerstörung, Änderung oder Entfernung von Stoffen, welche wir unter der Bezeichnung Hemmungskörper zusammenfassen können.

Solche Ursachen sind wohl an den hochinteressanten, biologischen Erscheinungen bei der Befruchtung beteiligt, welche Jaques Loeb vor mehreren Jahren beschrieben hat.

Auch der günstige Einfluss gewisser anderer Zusätze zu enzymhaltigen Lösungen besteht nicht selten darin, dass diese Zusätze die hemmende Wirkung von Paralysatoren aufheben. In diesem Sinne können wir die oft als Puffer bezeichneten sauren Salze als Schutzstoffe betrachten. Auch Soda, Calciumcarbonat u. a., welche z. B. imstande sind, Hefe gegen die Giftwirkung mehrerer Stoffe zu schützen, wirken eben durch ihr Neutralisationsvermögen (Henneberg, Zbl. f. Bakt. [2] **20**).

Hemmungskörper (Paralysatoren).

Die in letzter Zeit öfters angewandte Bezeichnung „Gift“ für alle Substanzen, welche katalytische Reaktionen verzögern oder aufheben, ist nicht durch die Erkenntnis neuer Beziehungen begründet. Der Name Vergiftung soll also für die Störung von Lebensfunktionen durch Paralysatoren reserviert bleiben.

Der Chemismus der Paralyse ist zwar noch fast vollständig in Dunkel gehüllt, indessen ist die Wirkung der in Rede stehenden Körper von bedeutendem Interesse für die Enzymologie, da sie bei allen länger dauernden Versuchen zum Sterilisieren unentbehrlich sind. Welchen Einfluss Paralysatoren, wie Chloroform u. a. zuweilen auf enzymatische Spaltungen ausüben

[1]) Die vielen Fälle, wo kleinere Salzkonzentrationen ohne merkbaren Einfluss sind, glaube ich hier nicht erwähnen zu sollen.

können, geht z. B. aus den Beobachtungen von E. Fischer über die Glukosidspaltung durch Hefeenzyme hervor (Chem. Ber. **28**, 1436; 1895).

Wie die Einwirkung der Aktivatoren, so hängt auch diejenige der Gifte und anderer Hemmungskörper von der Konzentration der Enzyme und der Reinheit der Lösung ab. Es wird behauptet, dass Enzymlösungen von Giften relativ um so mehr geschädigt werden, je geringer die Enzymkonzentration ist; nach dem Massenwirkungsgesetz ist diese Beziehung auffallend.

Anorganische Salze.

NaFl: Nach Arthus und Huber unschädlich für die löslichen Fermente, tötet nur Bakterien (C. r. **115**, 839; 1892). Lipase wird durch dieses Salz mehr als von irgend einem anderen Antiseptikum geschädigt (Loevenhart, Biochem. Zentralbl. **6**, 192). (Kastle und Loevenhart, Amer. Chem. J. **24**.) Chymosin wird geschädigt, nicht dagegen stärkere Trypsinlösungen (Kaufmann, H. **39**). Die Wirkung des Erepsins auf Dipeptide wird durch NaFl teils gehemmt, teils gefördet (Abderhalden, Caemmerer und Pinkussohn, H. **59**). NH_4Fl hebt nach Buchner die Wirkung der Zymase auf. Den Einfluss der Fluoride auf Thrombin haben Bordet und Gengou eingehend studiert (Ann. Inst. Pasteur **18**), den Einfluss auf Diastasen Effront.

$HgCl_2$: Schädigt Katalase noch in 0,00005 normaler Lösung. Giftig für Amylase schon in 0,001%iger Lösung; noch mehr für Urease. Schädigt Ptyalin in Lösungen von 0,005%. Ebenso Trypsin; viel weniger Erepsin (Euler, Ark. f. Kemi **2**). Auch Invertin wird geschwächt, aber relativ wenig (Duclaux).

$Hg(CN)_2$: Starke Schädigung der Katalase, wenn auch geringer als durch $HgCl_2$ (Faitelowitz).

$B(OH)_3$ hemmt Chymosin nach Duclaux, fördert im Gegenteil nach den neueren Angaben von Agulhon (C. r. **148**). Nach diesem Autor wirken die Kohlehydrate, Glukoside und Proteinstoffe hydrolysierender Enzyme noch unverändert in kalt gesättigter Borsäurelösung. Katalase wird etwas gehemmt.

As_2O_3. Arsenik schädigt — wie Buchner durch eine grosse Reihe von Versuchen gezeigt hat, die zellfreie Gärung, aber Eiweisskörper und Zucker wirken als Schutzstoffe gegen dieses Gift. Amylase wird durch Arsensalze geschädigt (Kjeldahl), ebenso Pepsin (Ascher).

H_2S schädigt die Katalase. Ohne Einfluss auf Pepsin, Trypsin, Diastase und Emulsin (Fermi und Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene **18**; 1894).

O_3 (Ozon). Während Wasserstoffsuperoxyd manche Enzymwirkungen fördert, und soweit bekannt nur Katalase langsam zerstört, hat Ozon einen schädlichen Einfluss, wie Sigmund für die meisten wichtigeren Enzyme. Kastle besonders für Lipase (Chem. Zbl. **77**, I, 1555; 1906) und Buchner und Hoffmann für die Zymase (Biochem. Z. **4**) nachgewiesen haben.

H_2O_2 begünstigt nach Vandevelde (Hofm. Beitr. **5**) die meisten Enzyme, nur Katalase wird etwas geschädigt.

Unter solchen Salzen, deren schädigende Wirkung mehr spezifisch ist, seien erwähnt:

Alkalisulfate verzögern die Pepsinverdauung, wie Grützner gefunden hat (Pfeiderer, Pflüg. Arch. **66**). (Bei Trypsin ist diese hemmende Wirkung wenig oder gar nicht vorhanden.)

$CaCl_2$ schwächt besonders stark das Invertin (Duclaux).

Eisensalze sollen Pepsin schädigen (Ascher).

Kaliumpermanganat hemmt die Lipase stark (Kastle und Loevenhart).

Nitrate und Chlorate werden als starke Katalasegifte bezeichnet.

Für einige andere, die Wirkung der Blutkatalase hemmenden Stoffe sind hier nach Senter (Zeitschr. physik. Chem. **51**) diejenigen Konzentrationen angegeben, welche erforderlich sind, um die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes zu vermindern.

Paralysator	g Moleküle pro Liter
J_2 in JK	$^1/_{50\,000}$
Hydroxylaminchlorhydrat	$^1/_{80\,000}$
KNO_3	$^1/_{40\,000}$
$KClO_3$	$^1/_{40\,000}$

Mit Katalase aus Froschmuskeln erhielt neuerdings C. G. Santesson (Skand. Arch. f. Physiol. **23**; 1909) ähnliche Resultate.

Durch anorganische Kolloide (Gold, Platin, Silber, Arsen, Kupfer, Quecksilber, Wismut) wird Pepsin nicht gefördert, in hohen Konzentrationen vielmehr gehemmt (Pinkussohn, Biochem. Z. **8**.).

Organische Gifte und Hemmungskörper.

Chloroform: Die ursprüngliche Angabe von Müntz, dass Chloroform nur die Mikroorganismen, nicht aber die Enzyme schädigt, musste später bedeutend modifiziert werden.

Chloroform schädigt: Amylase, Ptyalin, Hefeglukase, Pepsin, Labferment Urease, schädigt nicht oder wenig: Trypsin, Erepsin, Invertin, Maltase, Zymase. Betreffend Literatur vergl. Kaufmann (H. **39**).

Chloral: Oxydase (von Lepiota americana) wird vollkommen zerstört (Kastle und Loevenhart, Chem. Zbl. **77**, 1, 1554; 1906); Myrosin wird nur wenig geschwächt.

Formaldehyd: Lepiota-Oxydase wird auch durch 40% Formaldehyd nicht zerstört (Kastle und Loevenhart l. c.). Chymosin wird geschädigt,

ebenso Amylase. In 1%iger Lösung ohne Einwirkung auf Erepsin (Euler l. c). Zymase wird geschädigt, Pepsin erst durch starke Formollösungen.

Glycerin hemmt nicht unerheblich die Labwirkung (Reichel-Spiro, Hofm. Beitr. **7**).

Toluol: Dieser von E. Fischer zur Sterilisation von Enzymlösungen eingeführte Kohlenwasserstoff dürfte wohl in den allermeisten Fällen unschädlich sein. Urease soll jedoch geschwächt werden.

Phenol: Pepsin soll geschädigt werden, ebenso Amylase und Katalase.

Kresole: Unschädlich für Leberbutyrase (Kastle, Chem. Zbl. I, 1906.).

Thymol: Schädigt Oxydasen (Kastle und Loevenhart) und Speicheldiastase (Schlesinger, Pugliese; auch merkbar Zymase (Buchner) sowie Chymosin (Freudenreich). Schwächt stärkere Trypsinlösungen nicht (Kaufmann, H. **39**); auch nicht Hefemaltase (E. Fischer).

Maltose soll die peptische Verdauung verzögern (Sailer und Farr).

Salicylsäure: Für Pepsin und Trypsin wird Schwächung angegeben, ebenso wird Lipase geschädigt. Die Wirkung der Xanthinoxydase wird dagegen beschleunigt (Burian, H. **43**), ebenso die Autolyse.

HCN. Während Blausäure sich bekanntlich als ein äusserst starkes Katalasegift erwiesen hat, ist ihre schädigende Wirkung auf andere Enzyme bedeutend schwächer, zuweilen auffallend schwach. Zymase wird zwar vollständig inaktiviert, aber reversibel (Buchner). Auch Chymosin wird nach Fuld und Spiro nicht geschädigt; ebenso ist Pepsin indifferent. Die Erepsinspaltung von Polypeptiden wird durch sehr kleine Mengen Cyankalium gefördert, durch grössere gehemmt (Abderhalden, Caemmerer, Pinkussohn, H. **59**). Blausäure in 1%iger Lösung schwächt, aber zerstört nicht das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes (Hahn-Geret, Chem. Ber. **31**).

Die Empfindlichkeit der Katalase gegenüber HCN wird durch Messungen von Senter beleuchtet, neben denen noch einige an anderen organischen Giften erhaltenen Resultate angegeben sind[1]). Es vermindern auf die halbe Reaktionsgeschwindigkeit:

---

[1]) Faitelowitz hat mehrere Paralysatoren nach der Konzentration, in welcher sie die Milchkatalase schädigen, in folgende Reihe eingeordnet:

I	II
HCN	$H_2C_2O_4$
KCN	HNO_3
KCNS	$Ba(NO_3)_2$
$HgCl_2$	HCl
H_2S	CH_3COOH
$Hg(CN)_2$	

Paralysator	g Mol. pro Liter
HCN	$^1/_{1\,000000}$
Phenylhydrazin	$^1/_{20\,000}$
Anilin	$^1/_{400}$.

Alkaloide. Die ältere Literatur hierüber findet man bei Nasse (Pflüg. Arch. II) und in den Arbeiten von Chittenden, dem man auch sehr eingehende Untersuchungen verdankt. Die Alkaloide hemmen im allgemeinen die Enzymwirkungen, aber nicht sehr stark (Chittenden, Gockel) vergl. auch Laqueur (Arch. f. exp. Path. **55**; 1906), welcher besonders die Wirkung des Chinins auf Enzyme studiert hat; nach ihm werden das Ferment der Autolyse und die Oxydase des Blutes am stärksten durch Chinin gehemmt. Ascher konstatierte eine nachteilige Wirkung von Chininpräparaten auf die peptische Verdauung. Oxydasen scheinen besonders empfindlich gegen Alkaloide zu sein (Rosenfeld). Hordeninsulfat verzögert die peptische und tryptische Verdauung (Camus); dagegen nicht die Wirkung der Maltase, Invertase und Lipase.

Tannin schädigt Myrosin und Diastase; Pepsin schon in geringen Dosen (0,001 g; Asher, Boas Arch. **14**; 1908 u. a.). Dieser Einfluss dürfte in erster Linie auf Adsorption und Fällung der Enzyme beruhen.

Von praktischer Bedeutung für die Technik der Enzymologie sind ferner die Untersuchungen über die Einwirkung des Alkohols auf Enzyme:

Kleinere Mengen Alkohol wirken beschleunigend auf Lipase (Gizelt, Zbl. f. Physiol. **19**), hemmen aber sonst mehr oder minder vollständig, so z. B. Trypsin (Gizelt, l. c.), Lab (Reichel und Spiro, Hofm. Beitr. **7**) und Diastase. Nur Tyrosinase soll noch in 50% Methyl-Äthylalkohol wirken. Fast immer ist die Hemmung durch Alkohol reversibel.

Sogar sehr grosse Mengen werden bekanntlich eine Zeitlang von wohl allen Enzymen vertragen, wie aus den gebräuchlichen Ausfällungsmethoden hervorgeht. Wird nach Fällung des Enzyms der Alkohol entfernt, so ist das Enzym wieder wirksam (Schöndorff und Victorow, Pflüg. Arch. **116**)

Die Hemmungskörper entfalten wie die Aktivatoren ihre Wirkung durch Verbindung teils mit dem Substrat, teils mit dem Enzym, teils mit dem Aktivator. Diese Wirkungen dürften besonders oft in den Fällen eine Rolle spielen, wo die Paralysatoren Säuren und Basen sind. Ferner verändern die Schwermetallsalze den Lösungszustand kolloider Substrate wie Eiweisskörper, Stärke usw.

Während die Vergiftungs- und Lähmungserscheinungen von Zellen in weitem Umfang durch das Verhalten und die Veränderungen der lipoiden

CHEMICAL SOCIETY BURLINGTON-HOUSE, W.

Plasmahaut bestimmt werden, wie wir durch die Untersuchungen von Overton wissen, müssen wir annehmen, dass die Einwirkung von „Giften“ auf Enzyme rein chemischer Natur sind, etwa abgesehen von Fällungen oder Adsorption.

Über die entstehenden chemischen Verbindungen haben wir noch keinen Anhaltspunkt, da wir ja die reagierende Enzymsubstanz nicht kennen. Nicht selten scheinen die auftretenden chemischen Bindungen nur lose zu sein; die Fähigkeit der Enzyme, nach Entfernung des Paralysators die frühere Aktivität ganz oder teilweise wieder zu gewinnen, ist besonders bei „Vergiftung“ durch Blausäure auffallend.

Waren nur sehr geringe Mengen des Paralysators zugegen, so kann derselbe durch gleichzeitig anwesende Oxydationsmittel oder andere Enzyme ohne äussere Einwirkung zerstört werden. Hierauf ist die freiwillige Reaktivierung zurückzuführen, welche man, vermutlich um das Merkwürdige dieser Erscheinung zu betonen, als „Erholung“ bezeichnet hat.

An Analogien mit bekannten chemischen Vorgängen fehlt es auch hier nicht. Insbesondere ist die Wirkung von Paralysatoren auf Katalase mit derjenigen auf die Bredigschen sog. kolloiden Metalle beziehungsweise Oxyde und andere Oxydationskatalysatoren mehrfach verglichen worden. Aber auch die eingehenden Versuche von Senter, auf die oben verwiesen wurde, haben nicht näher aufklären können, welche chemische Veränderungen der aktive Sauerstoff, um dessen Wirkung es sich hier handelt, durch die Paralysatoren erleidet. Übrigens gehen die „Giftwirkungen“ bei Katalase und kolloidem Platin keineswegs parallel. Auch den interessanten Beiträgen, welche Höber (Pflüg. Arch. **82**, 631; 1900), sowie Loevenhart und Kastle (Amer. Chem. Journ. **29**) zu dieser Frage geliefert haben, kann wohl als hauptsächliches Resultat der Satz entnommen werden: „That the effect of any particular substance on the catalyzer can be explained, in the majority of cases at least, upon purely chemical grounds“.

In mancher Hinsicht schliessen sich den hier behandelten Hemmungskörpern die Antikörper an, und die Grenze des Begriffes Antikörper ist etwa durch ähnliche Merkmale bestimmt wie die Grenze des Begriffes Enzym gegenüber dem weiteren Bereich der Katalysatoren. Eine Reihe von Stoffen, welche enzymatische Reaktionen im normalen Organismus verzögern, sollten eigentlich ebenfalls als Hemmungskörper bezeichnet werden im Gegensatz zu den Antienzymen, welche der Organismus nach Einführung körperfremder Enzyme als Schutzstoffe bildet.

Zu einer derartigen kritischen Einteilung ist aber einstweilen das Tatsachenmaterial noch zu unvollständig, so dass wir alle in der Literatur als Antienzyme bezeichneten Stoffe in einem späteren Kapitel zusammenfassen.

Kap. IV.

Chemische Dynamik der Enzymreaktionen.

Die Beziehungen, welche die chemische Dynamik für die einfachsten Fälle katalytischer Reaktionen fordert, findet man bei enzymatischen Vorgängen in sehr ungleichem Grade erfüllt. In einigen Fällen gilt das Zeitgesetz für monomolekulare Reaktionen und die Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Katalysator mit grosser Schärfe; in der Mehrzahl der Fälle aber stimmen die experimentellen Befunde nur in einem beschränkten Konzentrationsbereich mit den Schulfällen der Reaktionslehre, und wir werden nicht wenige Reaktionen zu besprechen haben, für welche eine einfache theoretische Darstellung noch nicht gefunden ist.

Die Zusammenstellung der einzelnen enzymatischen Vorgänge nach den mathematischen Ausdrücken, denen sie folgen, ist scheinbar die nächstliegende. Sie lässt sich aber nur auf Kosten der Kürze und der Übersichtlichkeit durchführen, da ja, wie erwähnt, ein und dasselbe Enzym je nach den äusseren Umständen sich reaktionskinetisch ganz verschieden verhalten kann. Wir widmen deswegen jedem der wichtigeren Enzyme eine besondere Besprechung, indem wir mit den hydrolysierenden Enzymen beginnen und die Gärungsenzyme, die Oxydasen und die Katalasen folgen lassen.

Es soll nicht versäumt werden, hier zu betonen, wie notwendig bei der Verwertung der im folgenden mitzuteilenden quantitativen Ergebnisse eine kritische Prüfung der betreffenden Zahlen ist. Man hat es selbst in den günstigen Fällen, wo ein chemisch einheitliches Substrat zur Verwendung kam, mit Lösungen zu tun, welche einerseits einen chemisch unbekannten Katalysator in unbekannter Konzentration enthalten, andererseits durchweg durch die fremden Bestandteile des Enzympräparates verunreinigt sind, und zwar mit Stoffen, welche unter Umständen in minimalen Mengen einen entscheidenden Einfluss auf den Gang der zu beobachtenden Reaktion ausüben können; kurz, man ist in der misslichen Lage, quantitative Beobachtungen an einem qualitativ ungenügend erforschten System anzustellen.

Man kann dann fragen, ob die an Enzymlösungen gewonnenen quantitativen Messungen überhaupt einen Wert besitzen und ob eine Zusammenfassung

derselben angezeigt ist. Wenn die an einem Präparat gemachten Beobachtungen nur wenig umfassend sind und die Versuchsbedingungen unerheblich variiert wurden, ist in der Tat der Wert einer physikalisch-chemischen Untersuchung an Enzymen gering. Andererseits haben eine Reihe gründlicherer reaktionskinetischer Studien unsere Kenntnisse von den Enzymen entschieden erweitert, und besonders im Zusammenhang betrachtet geben uns diese Untersuchungen über die allgemeinen Reaktionsverhältnisse der Enzyme Aufschluss, und haben zur Ausarbeitung der enzymologischen Methodik wertvolle Beiträge geliefert.

Bevor wir die experimentellen Resultate im einzelnen betrachten, wird es zweckmässig sein, uns zu vergegenwärtigen, nach welchen theoretischen Grundsätzen wir dieselben beurteilen können.

Die theoretischen Grundlagen der enzymatischen Dynamik.

Der Inhalt des Massenwirkungsgesetzes darf hier wohl als bekannt vorausgesetzt werden. Dasselbe besagt bekanntlich, dass die aktive Masse eines Stoffes seinem osmotischen Druck und damit (innerhalb etwas engerer Grenzen) seiner Konzentration proportional ist. Verwandelt sich durch eine chemische Reaktion eine einzige Molekülart A von der Konzentration C_A in neue Stoffe, ohne dass dabei die Konzentration irgend einer anderen, gleichzeitig anwesenden Molekülart wesentlich verändert wird, so ist — bei gegebenen äusseren Umständen der Temperatur, des Druckes und des Mediums — die in jedem Zeitteil dt pro Volumeinheit umgewandelte Substanzmenge, dC_A, gegeben durch die Gleichung

$$v = \frac{dC_A}{dt} = k' C_A \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1a)$$

wo k' eine Konstante bedeutet, welche Geschwindigkeitskonstante (oder auch Reaktionskonstante) des Vorgangs genannt wird.

Diese Konstante k' behält also, wie betont werden soll, ihren Wert unvermindert bei, wie weit auch die Reaktion fortgeschritten sei, und welche Anfangskonzentrationen man gewählt habe.

Die Geschwindigkeit v dagegen, d. h. die in der Volumeinheit pro Zeitteil umgewandelte Substanzmenge, ist von der Konzentration C_A abhängig (damit proportional). Sie nimmt denselben Zahlenwert wie k' an, wenn $C_A = 1$ ist, d. h. wenn die sich umwandelnde Stoffmenge ein g-Molekül pro Liter beträgt und in irgend einer Weise auf dieser Konzentration erhalten wird.

Durch diese einfachste Gleichung lässt sich also ein chemischer Vorgang darstellen, welcher in einer Richtung (praktisch) vollständig verläuft.

Durch Integration von (1a) erhält man die Konstante für sog. monomolekulare Reaktionen:

$$k' = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \quad \text{oder} \quad k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1b)$$

wenn wir mit log dekadische Logarithmen bezeichnen, und also $k = 0{,}4343\ k'$ setzen [1]).

Als Beispiel einer enzymatischen Reaktion, bei welcher sich nur eine Molekülart umwandelt, sei die Zersetzung von Hydroperoxyd durch Katalase erwähnt; die Tabellen auf S. 155 zeigen, dass die Werte für k innerhalb der Versuchsfehler wirklich konstant sind.

Die genannte Gleichung findet man ausserdem in sehr zahlreichen Fällen bestätigt, in welchen ausser einem gelösten Substrat auch noch das Wasser an der Reaktion beteiligt ist. Da dies im Vergleich zur gelösten Substanz in grossem Überschuss vorhanden zu sein pflegt, so kann man seine Konzentration als konstant ansehen; es ändert sich auch in diesen Fällen praktisch nur die Konzentration einer einzigen Molekülart. So war das erste Beispiel für die Gültigkeit des monomolekularen Reaktionsgesetzes die Inversion des Rohrzuckers durch Säuren (Wilhelmy 1850). Hudsons neue, S. 115 wiedergegebene Messungen zeigen, dass das gleiche Gesetz auch für die Spaltung dieses Zuckers durch Invertase gültig ist.

Es mag hier darauf hingewiesen werden, dass das Gesetz der Massenwirkung, auf welchem die ganze chemische Kinetik ruht, sich aus den beiden Hauptsätzen der Thermodynamik herleiten lässt; es ist also unabhängig von unseren gegenwärtigen molekularkinetischen Vorstellungen. Dass das Massenwirkungsgesetz allen chemischen Vorgängen zugrunde liegt, kann also nicht bezweifelt werden; die Frage ist nur, wann und inwieweit die Voraussetzungen zutreffen, unter welchen es in der obigen einfachen Form zum Ausdruck kommt. Finden wir Abweichungen von den einfachen Formeln, zu welchen uns das Massenwirkungsgesetz führt, so haben wir zu fragen, welche Voraussetzungen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht erfüllt gewesen sind.

---

[1]) Verläuft eine Reaktion so, dass äquimolekulare Mengen zweier Stoffe zur Bildung des Reaktionsproduktes zusammentreten, also nach dem Schema

$$A + B \rightarrow C$$

so ist, wenn wir von den Konzentrationen a und b ausgehen und mit x die zur Zeit umgewandelte Menge dieser beiden Stoffe (also die gebildete Konzentration von C) bezeichnen, die Geschwindigkeit in jedem Augenblick proportional mit den Konzentrationen der beiden miteinander reagierenden Stoffe, also:

$$\frac{dx}{dt} = k\,(a-x)\,(b-x),$$

oder, wenn die beiden Stoffe von vornherein die gleiche Konzentration a haben,

$$\frac{dx}{dt} = k\,(a-x)^2.$$

Für letzteren, einfachsten Fall einer sog. bimolekularen Reaktion lautet das Integral:

$$k = \frac{1}{at}\,\frac{x}{a-x}$$

Enzymatische Vorgänge, welche nach der Gleichung für bimolekulare Reaktionen verlaufen, sind bisher nicht bekannt geworden.

Katalyse.

Die Spaltung des Rohrzuckers erfolgt bekanntlich in reinem Wasser ganz ausserordentlich langsam; einigermassen erheblich wird die Geschwindigkeit erst, wenn ausser dem Zucker noch eine Säure (oder ein Enzym, die Invertase) in der Lösung enthalten ist. Durch den Verlauf der Hydrolyse verändert sich die Konzentration der zugesetzten Säure, soweit wir durch Titration feststellen können, nicht. Auch gilt das Gesetz für monomolekulare Reaktionen unverändert, ob die Lösung 0,001 oder 0,1 g-Molekül Säure pro Liter enthalte, es ändert sich (solange wir im Gebiet wässerig verdünnter Lösungen bleiben) ausschliesslich der numerische Wert der Reaktionskonstanten k. Ein Katalysator ist deswegen, wie schon eingangs erwähnt, zu definieren als ein Stoff, welcher, ohne selbst durch die Reaktion verbraucht zu werden, die Geschwindigkeit ändert, mit welcher eine Reaktion ihre Gleichgewichtslage erreicht[1]).

Arrhenius hat 1884 die wichtige Entdeckung gemacht, dass die katalytische Wirkung verschiedener Säuren mit ihrer Leitfähigkeit, oder genauer, mit ihrem dissoziierten Anteil parallel geht.

Dieser Satz, welcher zahlreiche Bestätigungen erfahren hat und von der weitestgehenden Bedeutung war, lässt sich auch so ausdrücken, dass verschiedene Säuren hydrolytische Reaktionen proportional mit der Konzentration der Wasserstoffionen ihrer Lösungen katalysieren. Diese Tatsache findet man nicht selten in der Literatur so dargestellt, als ob die Wasserstoffionen allein das katalysierende Agens wären und als eine Art Kontaktsubstanz fungierten. Diese Vorstellung entspricht aber den chemischen Tatsachen keineswegs. Vielmehr wird man annehmen, dass durch die katalysierende Säure die Konzentration der die Reaktion vermittelnden Ionen vermehrt wird (Euler, Z. physik. Chem. **36**, 681, 1901.).

Die Annahme, dass die Verbindung des Katalysators mit dem Substrat die reaktionsvermittelnden Moleküle liefert, ist in der Enzymologie bereits zur allgemeinen Annahme gelangt; von den Autoren, welche sich auf Grund eigener Untersuchungen in diesem Sinne geäussert haben, seien nur genannt: Kastle und Loevenhart, Bach, Hanriot, A. Brown, H. Brown und Glendinning, Bodenstein, Henri, Medwedew, Hedin, Armstrong, Bayliss.

Die Verbindungen zwischen Enzym und Substrat scheinen nämlich bei vielen enzymatischen Reaktionen in viel höherem Grade aufzutreten, als dies bei der katalytischen Hydrolyse durch Säuren der Fall ist; allerdings ist es auch noch in keinem Falle festzustellen gelungen, wie grosse Anteile der gesamten anwesenden Enzym- und Substratmengen sich während der Reaktion binden.

---

[1]) Dies gilt für alle diejenigen Fälle, in welchen nicht ein Stoff seine eigene Umwandlung katalysiert, wie dies z. B. bei der Laktonbildung aus γ- und δ-Oxysäuren der Fall ist, wo die Oxysäuren proportional mit ihrem dissoziierten Anteil die Laktonbildung beschleunigen (Autokatalyse).

Es würde zu weit führen, hier auf die Gründe einzugehen, welche die verschiedenen Forscher veranlasst haben, eine Vereinigung zwischen Enzym und Substrat anzunehmen. Wir wollen nur in Kürze die mathematischen Formulierungen erwähnen, welche die in Rede stehende Hypothese gefunden hat.

Henri fand bei seinen Versuchen über die Inversion des Rohrzuckers, dass die Reaktionskonstanten 1. Ordnung stark anstiegen (Vergl. S. 114). Um sein Beobachtungsmaterial einem mathematischen Ausdruck anzuschliessen, hat Henri (Z. physik. Chem. **39**, 194, 1902) eine von Ostwald gegebene Herleitung (Lehrbuch d. allgem. Chemie **2**, 2, 265) benützt.

Wird eine Reaktion durch einen Stoff von der Konzentration p beschleunigt, so ist der obige Ausdruck $k(a-x)$ noch zu multiplizieren mit $(1+\varepsilon p)$, wo ε eine Konstante bedeutet. Für den Fall, dass das Reaktionsprodukt der beschleunigende Stoff ist, erhöht sich also die Geschwindigkeit im Verhältnis $1:\left(1+\varepsilon\frac{x}{a}\right)$, d. h. proportional mit dem umgesetzten Anteil $\frac{x}{a}$ des Substrates, und wir erhalten:

$$\frac{dx}{dt} = k_H \left(1+\varepsilon\frac{x}{a}\right)(a-x) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1c)$$

Die Integration ergibt:

$$k_H(1+\varepsilon) = \frac{1}{t}\left[\log\frac{a}{a-x} + \log\left(1+\varepsilon\frac{x}{a}\right)\right] \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1d)$$

oder

$$k_H(1+\varepsilon) = \frac{1}{t}\log\frac{a+\varepsilon x}{a-x} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1e)$$

Bei einer Berechnung mehrerer Versuchsreihen der Invertasenwirkung ergaben sich für die neue Konstante ε Werte, welche nahe 1 lagen, und es wurde daher $\varepsilon = 1$ gesetzt.

Die Gleichung geht dann über in

$$2k_H = \frac{1}{t}\left[\log\frac{a}{a-x} + \log\left(1+\frac{x}{a}\right)\right]$$

oder

$$2\ k_H = \frac{1}{t}\log\frac{a+x}{a-x} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (2)$$

Bald darauf hat Bodenstein die Henrischen Zahlen einer Bearbeitung unterworfen und machte die Annahme, dass sowohl der Rohrzucker a als dessen Spaltprodukte die Invertase schwächen, und zwar der Rohrzucker stärker als der Invertzucker. Er leitete hieraus die Formel ab:

$$k_B E = \frac{a+i}{t}\left[(m-n)\frac{x}{a+i} + n\log\frac{a}{a-x}\right] \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (3)$$

(Vergl. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse, Paris 1903. Seite 77 u. ff.)

Hier bedeutet i die Menge der von vornherein zugesetzten Menge Invertzucker. E bedeutet die Enzymmenge; m und n sind Konstanten, welche die spezifische Schwächung der Invertase durch Rohrzucker bezw. Invertzucker zum Ausdruck bringen. Bodenstein wählte für diese Konstanten die Werte $m = 2$ und $n = 1$, wodurch die stärkere Wirkung des Rohrzuckers zum Ausdruck kommt. Enthält die Lösung von vornherein kein Reaktionsprodukt ($i = 0$), so vereinfacht sich seine Formel auf folgende Gleichung:

$$k_B E = \frac{a}{t}\left[\frac{x}{a} + \log\frac{a}{a-x}\right] \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (4)$$

Während diese Formel die an mässig verdünnten Lösungen angestellten Beobachtungen ziemlich gut wiedergab, stimmten die von Henri an verdünnten Lösungen gewonnenen Zahlen nicht mit derselben überein.

Henri hat deshalb einen anderen Ausdruck abgeleitet, unter der Annahme, dass sowohl der Rohrzucker als der Invertzucker (besonders die Fruktose) sich mit dem Enzym verbinden (Lois générales S. 85 und ff. und C. r. **135**, 916, 1902).

Von der ursprünglichen Substanzmenge a seien x Moleküle gespalten, so dass $a - x$ Moleküle übrig sind. Die Enzymmenge sei E; ferner sei X die Quantität des Enzyms, welche frei ist, Z die Menge, welche zur Zeit t am Rohrzucker haftet und Y diejenige Menge, welche mit dem Invertzucker verbunden ist.

Zwischen Enzym und Substrat einerseits, Enzym und Reaktionsprodukt andererseits sollen Gleichgewichte bestehen, welche durch das Massenwirkungsgesetz geregelt werden. Demnach gelten für diese beiden Gleichgewichte die Beziehungen (falls 1 Molekül Enzym mit 1 Molekül Substrat zusammentritt):

$$X(a-x) = \frac{1}{m} Z \text{ und } X \,.\, x = \frac{1}{n} Y \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (5)\,(6)$$

wo m und n Gleichgewichtskonstanten sind.

Für die gesamte Enzymmenge E gilt ferner:

$$E = X + Y + Z \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (7)$$

Hieraus berechnet Henri die Menge X des freien Enzyms und Z der Verbindung Zucker-Enzym:

$$X = \frac{E}{1 + m(a-x) + nx} \text{ und } Z = \frac{mE(a-x)}{1 + m(a-x) + nx} \quad . \quad . \quad . \quad (8)\,(9)$$

Nun kann man zweierlei Annahmen machen:

1. Es wirke der freie Anteil des Enzyms auf den Zucker; in diesem Falle ist die Geschwindigkeit proportional der Menge des freien

Enzyms und der Menge Rohrzucker, also proportional mit X und mit a—x. Somit wird

$$\frac{dx}{dt} = \text{konst. } X\,(a-x) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (10)$$

Ersetzt man hierin X nach Gleichung (8), so erhält man:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\text{konst. } E\,(a-x)}{1 + m\,(a-x) + nx} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (11)$$

2. Würde die Reaktion im Gegenteil durch den Komplex Enzym-Zucker vermittelt, so wäre die Geschwindigkeit der Konzentration dieser Molekülart, also Z, proportional. Aus

$$\frac{dx}{dt} = \text{konst. } Z \text{ erhält man nach (9):}$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\text{konst. m. E}\,(a-x)}{1 + m\,(a-x) + nx} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (12)$$

Beide Annahmen führen also zu einem identischen Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit.

Arrhenius gibt unter der Annahme, dass sich Komplexe bilden, welche aus 1 Molekül Enzym, p Molekülen Substrat und q Molekülen der verschiedenen Reaktionsprodukte bestehen, obigem Ausdruck eine noch allgemeinere Form (Immunochemie, S. 40).

Man erhält nämlich für jede einzelne solche Molekülart eine Formel von folgender Art:

$$Z = \varkappa' X\,(a - x - \Sigma p\,Z)^p\,(x - \Sigma q\,Z)^q \text{ wo } E = X + \Sigma Z \quad . \quad . \quad . \quad (13)$$

Wenn wir annehmen, dass ΣZ klein gegen a und x ist, so erhalten wir

$$Z = \varkappa' X\,(a-x)^p\,x^q$$

und es wird

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa' X(a - x - \Sigma p\,Z)^a = \frac{\varkappa' E\,(a-x)^a}{1 + \Sigma \varkappa' (a-x)^p x^q} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (14)$$

Ist das erste Glied im Nenner, 1, klein gegen die Glieder unter dem Summationszeichen, so erhalten wir die Formel von Bodenstein, wenn wir $a = 1$ setzen und annehmen, dass unter Σ zwei Glieder stehen, eines in welchem $p = 1$ und $q = 0$ ist und ein zweites, in welchem $p = 0$ und $q = 1$ ist.

In einer zwei Jahre später erschienenen vorläufigen Mitteilung verspricht Henri (Z. physik. Chem. **51**, 19; 1905) eine neue Theorie der Enzymwirkung, welche den kolloiden Zustand der Enzyme berücksichtigt. Der gelöste Körper, etwa Zucker, soll sich nach dem Verteilungssatz zwischen der wässerigen Lösung und dem Kolloid verteilen, und für die Reaktionsgeschwindigkeit soll in erster Linie die Konzentration des Zuckers im Kolloid in Betracht kommen. In dieser Weise erklärt Henri die Ähnlichkeit der

allgemeinen Adsorptionskurve und der Kurve, welche den Einfluss der Rohrzuckerkonzentration auf die Inversionsgeschwindigkeit durch Invertase darstellt.

Einwandfreie Bestätigungen hat keine dieser Formeln und Theorien erfahren.

Wie bereits früher erwähnt, wird die Hydrolyse des Rohrzuckers, der Ester und anderer ähnlicher Stoffe durch Säuren beschleunigt, und zwar proportional mit der Konzentration der Wasserstoffionen der Lösung. Benutzt man, wie gewöhnlich, starke Säuren in grösserer Verdünnung, so tritt, da in diesen Fällen die elektrolytische Dissoziation beinahe vollständig ist, ziemlich angenäherte Proportionalität zwischen der Konzentration des Katalysators und der Reaktionsgeschwindigkeit ein.

Eine solche Proportionalität zwischen Konzentration des Katalysators und Reaktionsgeschwindigkeit finden wir bei zahlreichen Enzymreaktionen innerhalb recht weiter Konzentrationsgrenzen; wir verweisen z. B. auf die Wirkungen der Lipasen (S. 111 ff.), der Katalasen (S. 155), der Invertase (S. 117), und des Erepsins (S. 137).

Indessen ist eine Ausnahme von dieser einfachsten Beziehung seit langer Zeit bekannt. Die durch Pepsin in bestimmten Zeiten verdauten Eiweissmengen sind nicht den Pepsinmengen direkt, sondern den Quadratwurzeln derselben proportional. Es ist dies der Inhalt der 1885 von Emil Schütz aufgestellten Regel (H. **9**, 577; 1885).

Die Gültigkeit dieser Regel ist zwar oft — und auch in neuester Zeit — bestritten worden; indessen kann die Zuverlässigkeit der zahlreichen mit verschiedenen Methoden angestellten Versuche (vergl. S. 125 u. ff.), welche die Schützschen Zahlen — wir sprechen hier zunächst ausschliesslich von der Pepsinwirkung — bestätigt haben, nicht in Zweifel gezogen werden. Für die peptische Verdauung gilt also wenigstens im ersten Drittel der Reaktion die Schützsche Regel, und es handelt sich nun darum, diese experimentell gefundene Beziehung auf Grund der Lehre der chemischen Dynamik zu verstehen.

Die theoretische Herleitung der Schützschen Regel, welche Arrhenius vor kurzem gegeben hat, ist folgende (Medd. Nobel Inst. **1**, Nr. 9; 1908):

Um eine Vorstellung zu erhalten, welche Umstände die Schützsche Regel bedingen, machen wir folgende Überlegungen. Wenn die umgesetzte Menge mit x und die Zeit mit t bezeichnet wird, so verlangt diese Regel dass:

$$x = \varkappa_1 \sqrt{t} \text{ oder } x^2 = \varkappa_1^2 t \quad \ldots\ldots\ldots (15)$$

Durch Differentiation erhalten wir:

$$2\,x\,dx = \varkappa_1^2\,dt$$

oder:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\varkappa_1^2}{2} \cdot \frac{1}{x} \quad \ldots\ldots\ldots 16)$$

Damit also die Schützsche Regel gilt, ist es eine nötige und, wie leicht zu sehen, genügende Bedingung, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der umgesetzten Menge (x) umgekehrt proportional ist. Da die Schützsche Regel nur am Anfang der Reaktion zutrifft, so soll auch diese Proportionalität nur für die erste Zeit der Reaktion vorausgesetzt werden.

Eine solche Proportionalität kann folgendermassen zustande kommen: Die Reaktionsgeschwindigkeit ist — falls von jedem der reagierenden Körper nur eine Molekel in das Reaktionsprodukt eingeht — dem Produkt der Konzentrationen der reagierenden Substanzen proportional. — Im Anfang der Reaktion sind so geringe Mengen der reagierenden Körper umgesetzt, dass ihre Totalmengen im allgemeinen mit genügender Annäherung als konstant angesehen werden können. Hier haben wir also den Grund für die Begrenzung der Gültigkeit der Schützschen Regel am Anfang der Reaktion. Nun soll die wirksame Menge (M) eines der reagierenden Körper der umgesetzten Menge, oder mit anderen Worten der Menge von neugebildetem Produkt (x) umgekehrt proportional sein, also muss:

$$M = \frac{\text{konst.}}{x} \text{ oder } Mx = \text{konst.}$$

Dies tritt offenbar ein, wenn ein chemisches Gleichgewicht zwischen dem neugebildeten Produkt und einem der reagierenden Körper auf der einen Seite und einer Verbindung von ihnen, deren Menge nahezu konstant bleibt, auf der anderen Seite besteht. Einen solchen Fall kennen wir schon von den wohlbekannten Verseifungen, nämlich wenn Ammoniak auf einen Ester, z. B. Äthylacetat einwirkt. Der eine reagierende Körper ist nämlich dann das Ion OH, und die Menge (M_{OH}) dieses Ions wird durch die bei der Reaktion entstehenden NH_4-Ionen des Ammoniumacetats (Menge x_{NH_4}) vermindert nach der Gleichung:

$$M_{OH} \cdot x_{NH_4} = C_1 (N_{NH_4OH} + N_{NH_3})$$

wo N_{NH_4OH} und N_{NH_3} die Mengen der NH_4OH- und NH_3-Molekeln bedeuten. Das Volumen bleibt nämlich während der Reaktion konstant. Die letztere Menge kann als konstant angesehen werden, so lange wir nur den Anfang der Reaktion betrachten.

Arrhenius hat nun diesen Fall näher untersucht, wobei eine Analogie mit dem Verlauf der peptischen Verdauung deutlich hervortrat.

Wir betrachten also mit Arrhenius ein System, in welchem Ammoniak von der anfänglichen Menge A auf Äthylacetat einwirkt, und zwar nehmen wir der Einfachheit halber an, dass die Menge des Äthylacetats so gross sei, dass sie nicht merklich durch die Reaktion verändert wird, sondern während der Reaktion als konstant (P) betrachtet werden kann; d. h. das Äthylacetat möge in grossem Überschuss anwesend sein. Wenn nun x Molekeln Ammoniumacetat, das bei grossen Verdünnungen, die wir hier

voraussetzen wollen, als vollkommen in NH_4- und CH_3CO_2-Ionen gespalten angesehen werden kann, zur Zeit t gebildet sind, so sind (a — x) Molekeln Ammoniak zur selben Zeit vorhanden. Wegen des geringen Dissoziationsgrades des Ammoniaks ist nur ein sehr geringer Bruchteil davon in NH_4- und OH-Ionen umgewandelt, so dass wir mit genügender Annäherung die nicht dissoziierte Ammoniakmenge ebenfalls mit a—x bezeichnen können. Schon bei Anwesenheit einer sehr geringen Menge Ammoniumsalz können wir die aus dem Ammoniak herrührenden NH_4-Ionen im Vergleich mit den von dem Salz abgespaltenen vernachlässigen, so dass wir die Menge der NH_4-Ionen mit x bezeichnen können. Nach dieser Voraussetzung muss von den allerersten Momenten der Reaktion abgesehen werden, in welchen noch kein oder nur sehr wenig Ammoniumsalz vorhanden ist. Die Konzentration der Hydroxylionen, q, ist demnach durch folgende Gleichung bestimmt:

$$q \,.\, x = K_2 \,(a—x)$$

wo K_2 die Dissoziationskonstante des Ammoniaks bedeutet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Verseifung ist nun proportional der Menge der Hydroxylionen (q) und der Menge des Äthylacetats (P), folglich gilt:

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa_2 K_2 \frac{a—x}{x} \cdot P = \varkappa P \frac{a-x}{x} \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; (17)$$

wo $\varkappa_2$ und $\varkappa$ Konstanten sind und $\varkappa \,.\, P$ als eine neue Konstante betrachtet werden kann, da P sich bei einem Einzelversuch nicht verändert.

Die letzte Gleichung gibt nach Integration:

$$F\,(x) = a \ln \frac{a}{a—x} — x = \varkappa P \, t \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; (18)$$

Die folgende Tabelle, ein Auszug aus der von Arrhenius mitgeteilten, gibt einen Doppelversuch wieder, bei welchem eine gegebene Ammoniakmenge auf 0,66 normales Äthylacetat bei $14{,}8^0$ einwirkte.

Mittel von $\varkappa P = 21$.

t	Umgesetztes Ammoniak in % beobachtet [1]	berechnet	$\varkappa P$
1	17,5	19,4	17,4
2	25,5	25,2	22,0
3	30,7	30,6	21,2
5	38,5	38,5	20,9
10	51,2	51,3	20,9
15	59,6	59,7	20,9
22	67,5	68,0	20,6
30	74,5	74,7	21,2
50	84,8	85,0	20,8
70	91,1	90,7	21,6
100	95,3	95,3	21,1

Wie man sieht, stimmt die Formel (18) ausgezeichnet.

[1]) Mittel aus 2 Versuchen.

Die Analogie der Esterverseifung durch Ammoniak und der Eiweissverdauung durch Pepsin ist nun nach Arrhenius folgende:

Bei der Eiweissspaltung werden Albumosen und Peptone gebildet. Das Pepsin wird zum grössten Teil von den Reaktionsprodukten gebunden, und es herrscht das Gleichgewicht:

[Freies Pepsin] × [Reaktionsprodukt] = konst. [Gebundenes Pepsin].

Die freie Pepsinmenge ist der Menge der gebildeten Reaktionsprodukte, d. h. (x), nahezu umgekehrt proportional. Dies gilt, sobald soviel Reaktionsprodukte gebildet sind, dass ihr Hauptteil nicht vom Pepsin gebunden ist, während umgekehrt der Hauptteil des Pepsins gebunden ist.

Die freie Pepsinmenge ist ferner offenbar der angewandten Pepsinmenge proportional. Wir erhalten also hier, wenn wir mit [E] die Konzentration des Enzyms (Pepsins) bezeichnen, mit $a - x$ das unveränderte Eiweiss und mit x die Verdauungsprodukte:

$$\frac{dx}{dt} = \varkappa [E] \frac{a - x}{x} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (19)$$

und demgemäss, wenn wir die Menge der Spaltprodukte auf Bruchteile von 1000 beziehen:

1000 (ln 1000 — ln unverändertes Eiweiss) — verdautes Eiweiss $= \varkappa [E]t$ (20).

Wirklich schliesst sich die peptische Verdauung auffallend gut der Arrheniusschen Formel an, und da sie innerhalb weiterer Grenzen der Enzymkonzentration und der Substratkonzentration gilt, als irgend eine andere für die Pepsinverdauung aufgestellte Formel, so ist die Arrheniussche Arbeit über die Schützsche Regel hier ausführlich referiert worden.

Ob freilich die hier wiedergegebenen Ableitungen allen für die peptische Verdauung wesentlichen Tatsachen und Faktoren, z. B. der Bindung der Salzsäure bei der Pepsinverdauung (vergl. hierzu Jastrowitz, Biochem. Z. **2**, 157; 1907), Rechnung trägt, lässt sich gegenwärtig schwer entscheiden. Insbesondere ist man noch darüber im unklaren, wie grosse Anteile des Pepsins unter bestimmten Bedingungen sich mit Substrat oder Reaktionsprodukten und mit der Salzsäure vereinen. Das einzige, was wir sagen können, ist, dass hier die sterische Konfiguration der beteiligten Stoffe eine sehr wesentliche Rolle spielt. Man kann dies aus dem Einfluss entnehmen, welchen Zusätze optisch aktiver Körper auf die Verdauungsvorgänge ausüben.

Umkehrbare Reaktionen.

Einfluss der Reaktionsprodukte. Wir haben im vorstehenden die hydrolytischen Enzymreaktionen so behandelt, als verliefen sie vollständig in einer Richtung, oder genauer, als sei die synthetische Gegenreaktion so unbedeutend, dass sie vernachlässigt werden kann. Wir wissen, dass die Spaltung

des Rohrzuckers durch Säuren, diese klassische Reaktion der chemischen Dynamik, unter gewöhnlichen Umständen praktisch vollständig verläuft, und erwarten zunächst, dass dies auch bei der enzymatischen Hydrolyse der Fall ist. Nun haben neuere Untersuchungen von Y. Osaka (Journ. Coll. of Science, Tokyo **25**, 1; 1908) ergeben, dass selbst beim Rohrzucker, wenn wir nur genügend konzentrierte Lösungen anwenden, das Gleichgewicht nachweisbar wird, wie dies ja allgemein bei den Estern organischer Säuren der Fall ist. Die Veränderung, welche ein solches reversibles System mit der Zeit erfährt, ist die Differenz zweier einander entgegengesetzten Wirkungen.

Es ist z. B. die Geschwindigkeit der Esterspaltung v_1 gegeben durch die Gleichung

$$v_1 = k_1 [\text{Ester}]$$

wenn wir mit [ ] wie immer die Konzentration bezeichnen. Die Geschwindigkeit der Esterbildung v_2 ist ausgedrückt durch

$$v_2 = k_2 [\text{Säure}] [\text{Alkohol}]$$

und der tatsächliche zeitliche Fortschritt in einem nicht im Gleichgewicht befindlichen System, das Ester, Säure, Alkohol und Wasser enthält, ist

$$v = v_1 - v_2 = k_1 [\text{Ester}] - k_2 [\text{Säure}] [\text{Alkohol}]$$

bezw., wenn wir von einer reinen Esterlösung von der Konzentration a ausgegangen sind, und die zur Zeit t umgewandelte Menge mit x bezeichnen:

$$\frac{dx}{dt} = v = v_1 - v_2 = k_1 (a - x) - k_2 x^2 \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (21)$$

Ist die Konstante der „Gegenreaktion“ nicht verschwindend klein, so ändert sich, wie leicht ersichtlich, der zeitliche Verlauf des totalen Vorganges v, wenn Reaktionsprodukte, x, dem Systeme von vornherein zugesetzt werden, und zwar muss allgemein ein Zusatz von Reaktionsprodukten den Fortschritt einer umkehrbaren Reaktion hemmen.

Hat man k_1 und k_2 experimentell bestimmt, so ist es leicht zu berechnen, wie sich v mit steigenden Zusätzen von x ändert. Für verdünnte Lösungen und anorganische Katalysatoren sind die Verhältnisse vollständig durchgearbeitet[1]).

Bei Enzymreaktionen kommt nun noch ein Umstand in Betracht, welcher die Verhältnisse etwas kompliziert. Wir haben uns bereits oben der nunmehr allgemein gewordenen Annahme angeschlossen, dass die Enzyme mit Substrat und Reaktionsprodukten zu Verbindungen zusammentreten. Wir wissen zwar noch von keinem Enzym, in welchem Maasse es eine solche Verbindung eingeht, aber wir nehmen an, dass dieselbe den zeitlichen

[1]) In einer 1906 für umkehrbare Enzymreaktionen aufgestellten Modifikation dieser Gleichung versucht B. Moore auf die Aktivität der Enzyme Rücksicht zu nehmen.

Verlauf stark beeinflusst, und so verstehen wir, dass sich die Geschwindigkeit einer enzymatischen Hydrolyse stark ändern kann, wenn wir von vornherein Reaktionsprodukte zusetzen.

Ein solcher Einfluss ist nicht nur oft qualitativ beobachtet, sondern mehrfach zahlenmässig festgestellt worden.

Unter den Versuchen, welche die hemmende Einwirkung der Spaltprodukte zeigten, ist der von W. Kühne (Lehrb. d. physiol. Chem. 1866 S. 39) angegebene wohl einer der ersten: Bringt man eine vom überschüssigen, unverdauten Fibrin abfiltrierte Verdauungsflüssigkeit auf einen Dialysator, so diffundiert der grösste Teil der Peptone in das Wasser, während das Pepsin auf dem Dialysator zurückbleibt. Die während des Diffusionsprozesses wasserreicher gewordene Lösung löst dann nach dem Verdunsten auf ihr ursprüngliches Volumen und Herstellung ihres anfänglichen Säuregrades fast genau ebensoviel Fibrin auf, als sie schon einmal gelöst enthielt. Die Peptone sind es folglich, welche die Verdauung hindern.

Wir erinnern sodann an die bereits früher zitierte Untersuchung von Tammann (H. **16**, 271; 1891), welcher zur Überzeugung gelangte, dass im allgemeinen die Spaltprodukte die Vollständigkeit der enzymatischen Reaktionen beeinträchtigen; aber, wie er sagt, „nicht nur durch Entfernung und Vernichtung der Spaltungsprodukte ist man imstande eine Fermentreaktion vollständig zu machen, sondern auch durch wiederholten Zusatz von Ferment wird dasselbe Ziel erreicht".

Von seinen zahlreichen Versuchen seien folgende erwähnt:

Zu verschiedenen Lösungen, die je 0,51 g Amygdalin enthalten, fügt man immer die gleiche Menge Emulsin, aber verschiedene Mengen von gesättigter Benzaldehydlösung und bringt alle Lösungen auf 25 ccm. Im Endzustande sind dann (bei 20°) folgende Amygdalinmengen zersetzt worden:

Menge der Lösung von Aldehyd	Zersetzte Amygdalinmengen in %	
0 ccm	20,3	
1 „	18,8	
5 „	14,7	
10 „	11,3	Fällung von Emulsin
In mit Benzaldehyd gesättigter Lösung	5,7	Fällung von Emulsin

Noch stärker wirkt Blausäure:

In 25 ccm Lösung bei 30° je 0,50 g Emulsin auf 0,001 g-Mol. Amygdalin:

Zusatz von Blausäure	Amygdalin gespalten
0,0000 g-Mol.	23,7
0,0001	18,7
0,0002	16,4
0,0003	12,1

Erheblich weniger stark hemmt das dritte Spaltprodukt, der Traubenzucker.

Wie gross die Hemmung ist, zeigt folgende Tabelle von Auld:

Minuten	g zugesetzte Glukose	hydrol. Amygdalin in %
30	0,0	13,5
30	0,2	13,3
30	0,75	11,8
30	1,0	11,6

Zur weiteren Erforschung dieser Beeinflussung ist wohl zu berücksichtigen, dass sich das Emulsin aus mehreren spezifisch wirkenden Enzymen zusammensetzt.

Dass ein durch den entstehenden Zucker beeinflusster Endzustand bei der diastatischen Hydrolyse der Stärke eintritt, erwähnen Moritz und Glendinning (Journ. Chem. Soc. **61**, 689; 1892).

Zahlreiche Versuche über die Abhängigkeit der Rohrzuckerinversion von zugesetzter Glukose und Fruktose hat Henri angestellt, da ja die Feststellung dieser Funktion für die Begründung seiner Formel wichtig war. Es ist, wie schon mehrfach erwähnt, sehr zu bedauern, dass seine Versuchszahlen durch die Multirotation der Glukose stark entstellt sind und sich deswegen rechnerisch kaum verwerten lassen. Allerdings scheint es, dass der Invertzucker die Inversionsgeschwindigkeit herabsetzt. Aus den Henrischen Zahlen (l. c. S. 202) ist folgende Tabelle zusammengestellt:

	2 ccm Enzymlösung + 50 ccm 0,2 norm. Rohrzuckerlösung	
	ohne Zusatz	+ 0,3 norm. Invertzucker
t	$\frac{x}{a}$	$\frac{x}{a}$
99	0,138	0,072
215	0,301	0,160
299	0,407	0,224
459	0,594	0,340
586	0,700	0,417
1202	0,927	0,672

Die 0,2 norm. Rohrzuckerlösung, welche ausserdem 0,3 norm. in bezug auf Invertzucker war, wurde also nur etwa halb so schnell gespalten wie ohne diesen Zusatz.

Dieser hemmende Einfluss des Invertzuckers soll ausschliesslich die Wirkung der Fruktose sein. Als Beleg gibt Henri folgende Tabelle für $\frac{x}{a}$.

Zeit	0,2 norm. Rohrz.	0,2 norm. Rohrz. + 0,2 norm. Glukose	0,2 norm. Rohrz. + 0,2 norm. Fruktose	0,2 norm. Rohrz. + 0,2 norm. Invertz.
75	0,142	0,144	0,123	0,119
184	0,385	0,362	0,317	0,306
275	0,564	0,532	0,457	0,446
445	0,798	0,746	0,672	0,648
605	0,906	0,878	0,799	0,794

Die Reaktionshemmung durch die Spaltprodukte ist, wie man sieht, ausgeprägt spezifisch, ein Befund, welcher sehr scharf in einer von E. F. Armstrong (Proc. Roy. Soc. **73**, 516; 1904) gegebenen Tabelle über die Hemmung von Zuckerspaltungen durch Hexosen zum Ausdruck kommt. Noch auffallendere Beispiele von Spezifität der Hemmungen werden wir wohl bald durch die bereits begonnene Untersuchung der Polypeptide erhalten.

Schon oben haben wir Kühnes Versuch über den Einfluss der Spaltprodukte auf die peptische Fibrinverdauung zitiert. Über die Hemmung der tryptischen Kasein-Verdauung durch Albumosen, Peptone und Aminosäuren hat Bayliss Versuche angestellt (Arch. d. Sciences Biol. **9**, Suppl. S. 261 u. ff; 1904); nach ihm sollen die Aminosäuren — Glykokoll und Leucin wurden geprüft — am wirksamsten sein.

Bei der Untersuchung der Dipeptidspaltung durch Erepsin hat Euler auch einige Versuche über den Einfluss der Aminosäuren gemacht; es handelte sich um Glycylglycin und Glykokoll (H. **51**, 213; 1907). Dabei zeigte es sich, dass ein Zusatz von Glykokoll nur eine untergeordnete Rolle spielt.

0,10 n Glycylglycin; 0,04 n Na.

Minuten	1000 (a—x)	1000 k
0	955	—
8	852	6,25
16	766	6,00
25	678	5,95

0,05 n Glycylglycin; 0,10 n Glykokoll; 0,04 n Na.

Minuten	1000 (a—x)	1000 k
0	480	—
10	414	6,40
18	372	6,20
27	329	6,08

0,20 n Glycylglycin; 0,05 n Na.

0	1860	—
6	1692	6,9
12	1545	6,7
20	1376	6,55
30	1210	6,2

0,10 n Glycylglycin; 0,2 n Glykokoll; 0,05 n Na.

0	900	—
6	829	5,9
12	767	5,8

Hierbei ist natürlich wesentlich, dass man durch den Zusatz des Glykokolls das Verhältnis zwischen NaOH und den anwesenden Säuren (Dipeptid + Aminosäure) nicht merkbar ändert.

Besondere Erwähnung verdienen noch die Arbeiten von Abderhalden und Gigon (H. **53**, 251; 1907) über die Spaltung von Glycyl-l-Tyrosin. Hier hemmt das in Lösung befindliche Tyrosin erheblich. Auch von vornherein zugesetzte aktive Aminosäuren verzögern bedeutend, besonders diejenigen, welche in der Natur vorkommen: d-Alanin, l-Serin, l-Leucin, d-Glutaminsäure, l-Phenylalanin, d-Tryptophan, l-Diaminotrioxydodekansäure.

Die Grössenordnung der Hemmung geht aus folgenden Versuchen hervor:

0,1 g Glycyl-l-tyrosin + 1 ccm Hefepresssaft		0,1 g Glycyl-l-tyrosin + 1 ccm Hefepresssaft + 0,05 g d-Glutaminsäure		
Minuten	Abgelesene Drehung	Minuten	Abgelesene Drehung	Drehungsvermögen der Glutaminsäure abgezogen
0	+ 0,70°	0	+ 0,70°	+ 0,55°
9	+ 0,51	7	+ 0,55	+ 0,47
23	+ 0,20	19	+ 0,54	+ 0,46
34	+ 0,00	29	+ 0,54	+ 0,46
		49	+ 0,53	+ 0,45
		79	+ 0,53	+ 0,45
		105	+ 0,47	+ 0,39

Glykokoll, l-Alanin und d-Leucin zeigen dagegen keinerlei hemmende Wirkung, die Racemkörper, wie d-l-Alanin, hemmen schwach. Aus den spezifischen Einflüssen, welche somit die Spaltprodukte gegenüber der Polypeptidverdauung zeigen, lässt sich wiederum schliessen, dass das hydrolysierende Enzym in direkte Bindung mit den genannten Eiweissabbauprodukten tritt. Etwa gleichzeitig hat Chodat ähnliche Messungen mit l-Tyrosinanhydrid und Glycyl-l-Tyrosinanhydrid ausgeführt (Arch. sc. phys. nat. **26**, 112; 1907). In grösster Verdünnung beschleunigen die Aminosäuren. Ferner weisen Abderhalden und Gigon auf den Unterschied hin, welcher zwischen der Verdauung in vitro besteht, wo die Spaltprodukte der Proteine intensiv hemmen, und der Verdauung im Darmkanal, wo die hemmenden Spaltprodukte durch Resorption schnell entfernt werden.

Mit anderen Worten: Im Organismus haben wir (in gewissen Zeiträumen) sog. stationäre Zustände, in welchen die Stoffe, welche durch die Enzyme verarbeitet werden und dann durch Diffusion oder in anderer Weise aus dem Wirkungsbereich des Enzyms austreten, kontinuierlich durch eine äquivalente Menge neuen Ausgangsmateriales ersetzt werden. Solche Fälle stationärer chemischer Vorgänge lassen sich etwa durch folgendes Schema veranschaulichen, wenn wir die monomolekulare Reaktion $A \rightarrow B + C$ betrachten.

⟶ Eintritt von A x g-Mol pro Zeiteinheit	Grenzfläche	Reaktionsgebiet. Umwandlung von x g-Mol pro Zeiteinheit	Grenzfläche	Austritt von B und C je x g-Mol pro Zeiteinheit ⟶

Unter den angegebenen Umständen gilt die einfache Beziehung:

$$\frac{dx}{dt} = \text{Konst.}$$

Damit ein derartiger stationärer Zustand eintritt, braucht ein System keineswegs durch feste Wände abgegrenzt zu sein. H. Goldschmidt (Z. physik. Chem. **31**, 235; 1899) hat einen chemischen Vorgang studiert, in welchem obige Gleichung realisiert ist:

Schüttelt man eine im Überschuss angewandte Menge eines in Wasser schwer löslichen Esters mit einer verdünnten Salzsäurelösung, in welcher der Ester

(soweit er gelöst ist) mit einer gewissen Geschwindigkeit hydrolytisch gespalten wird, so hält man eben durch das Schütteln die Konzentration des gelösten Esters konstant, da diejenigen Mengen, welche durch die hydrolytische Spaltung verschwinden, durch Diffusion der Lösung stetig wieder zugeführt werden. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit nicht sehr gross, so kann durch Diffusion stets der Ester, der durch die Reaktion aus der wässerigen Phase verschwindet, vollständig nachgeliefert werden, und der Ester wird also in der wässerigen Lösung stets auf konstanter Konzentration erhalten, nämlich derjenigen, welcher der Sättigung entspricht.

Die sonst gültige monomolekulare Reaktionsgleichung

$$\frac{dx}{dt} = (a - x) \cdot k \text{ geht über in } \frac{dx}{dt} = k''$$

da hier ja stets $a - x = a =$ Konst.

Bedingung für einen solchen Reaktionsverlauf ist also, dass die Phase, in welcher die Reaktion sich abspielt, stets in Bezug auf das Substrat gesättigt ist; man kann dies ausser durch kräftiges Rühren des heterogenen Systems auch durch äusserst feine Verteilung des sich lösenden Körpers erreichen, so dass die Berührungsfläche zwischen ihm und der Lösung sehr gross wird. Derartige ausserordentlich grosse Grenzflächen kommen besonders in sogenannten kolloiden Lösungen vor.

Hervorheben möchte ich auch wieder in diesem Zusammenhang, dass die Beschleunigung oder Verzögerung, welche eine enzymatische Reaktion in ihrem Verlauf erfährt, bei weitem nicht immer auf die Bindung des Enzyms durch die Spaltprodukte zurückgeführt werden kann. In vielen, vielleicht sogar in der Mehrzahl der Fälle wird es sich um die Konzentrationsveränderung der beteiligten Aktivatoren (Ko-Enzyme etc.) handeln, sei es, dass die Spaltprodukte und das Substrat mit diesen Stoffen in reversibler Weise zusammentreten, sei es, dass sie durch Nebenreaktionen verändert oder zerstört werden. Wir haben bereits Gelegenheit gehabt darauf hinzuweisen, dass die Abweichung vom theoretischen Reaktionsverlauf, welche wir als die Regel von Schütz bezeichnen (siehe S. 95), nach den Daten, welche bis jetzt über die peptische Verdauung vorliegen, sehr wohl durch die fortschreitende Bindung der Salzsäure durch die entstehenden Albumosen und Peptone verursacht sein könnte, wodurch sowohl dem Substrat als dem Pepsin Salzsäure entzogen wird, und es ist zu hoffen, dass Verdauungsversuche, welche in vitro bei konstant gehaltener Konzentration der Salzsäure angestellt werden, den gewünschten Aufschluss über diese nicht unwichtige Frage bringen.

Es ist eine theoretische Forderung, dass alle Reaktionen, auch wenn sie scheinbar vollständig verlaufen, schliesslich bei einem Gleichgewichtszustand stehen bleiben. Oft gehen die chemischen Reaktionen so weit in einer

Richtung, dass die Gleichgewichtslage sich unter gewöhnlichen Umständen analytisch nicht nachweisen lässt; erst in sehr konzentrierten Lösungen pflegt dann das Gleichgewicht zutage zu treten. Wie das Gleichgewicht einer umkehrbaren Reaktion $A \rightleftarrows 2B$ von den Geschwindigkeiten der beiden einander entgegengesetzten Vorgänge $A \rightarrow 2B$ und $A \leftarrow 2B$ abhängt und wie natürliche Gleichgewichte und enzymatische Endzustände verknüpft sind, soll im Kapitel VI besprochen werden.

Wir können also hiermit unsere kurze Übersicht über die Theorie der enzymatischen Dynamik abschliessen und werden im folgenden sehen, wie sich die experimentellen Ergebnisse mit den Forderungen der Theorie vereinbaren lassen.

II. Experimentelle Ergebnisse über den Verlauf enzymatischer Reaktionen.

Esterasen und Lipasen.

Mit Esterasen, also Enzymen, welche niedrigere Ester, nicht aber Neutralfette spalten, haben Kastle und seine Mitarbeiter (Amer. Chem. J. **24**, 491; 1900 und **31**, 521; 1904) ihre Versuche angestellt; zur Verwendung kamen trübe, durch Tuch filtrierte wässerige Extrakte von Schweine-Pankreas.

Röhrchen, welche 4 ccm Wasser, 0,1 ccm Toluol und 0,26 ccm Äthylbutyrat enthielten, wurden während 5 Minuten auf 40° erwärmt. Dann wurde 1 ccm eines 10%igen Extraktes hinzugefügt; nach einer bestimmten Zeit wurde mit $^1/_{20}$ norm.-KOH titriert.

Minuten	x	$k \cdot 10^5$	$\varkappa \cdot E$
5	(6,53)	1354	(0,45)
10	(8,66)	907	(0,40)
15	8,53	597	0,26
20	9,54	500	0,24
25	10,67	500	0,24
30	(9,41)	329	(0,16)
60	17,32	316	0,28
120	25,35	244	0,32
180	28,36	184	0,28

Die nach dem Reaktionsgesetz 1. Ordnung berechnete Konstante k sinkt stark und stetig. Eine Interpolation zeigt übrigens, dass die Beobachtungsfehler, vermutlich wegen der Schwierigkeit, so kleine Estervolume genau zu pipettieren, sehr gross waren; die eingeklammerten Werte fallen ganz aus der Kurve. Für die übrigen habe ich nach der Formel (18)

$$a \ln \frac{a}{a - x} - x = \varkappa E t$$

die Werte $\varkappa E$ berechnet, wobei sich offenbar ein befriedigender Anschluss an die Formel ergibt. Diese Formel ist (S. 95—97) unter der Annahme abgeleitet worden, dass die Konzentration des freien Enzyms der Konzentration der Reaktionsprodukte umgekehrt proportional ist. Die gleiche Formel ergibt sich unter der, wenigstens in diesem Fall wahrscheinlichsten Annahme, dass nicht die Konzentration, sondern die Wirksamkeit des Enzyms umgekehrt proportional mit den Reaktionsprodukten ist, von welchen in erster Linie die Säure in Betracht kommt. Wie Kastle und Loevenhart gefunden haben, ist nämlich die Pankreaslipase stark säureempfindlich. Es würde sich wohl lohnen, zu untersuchen, ob nicht die Formel für monomolekulare Reaktionen recht angenähert gilt, wenn von vornherein eine gewisse Menge einer starken Säure zugesetzt wird, wodurch die Einwirkung der Reaktionsprodukte zurückgedrängt wird.

Die Messungen, welche Stade mit Eidotter-Emulsion und neutralisiertem Magensaft angestellt hat (Hofm. Beitr. **3**, 291; 1902) sind von Arrhenius nach obiger Formel berechnet worden und fügen sich, wie die folgende Tabelle zeigt, derselben sehr gut.

Stunden	x beobachtet	x berechnet	
2	0,204	0,186	$\varkappa E = 10$
4	0,256	0,257	
6	0,298	0,308	
8	0,353	0,348	
10	0,376	0,383	
25	0,495	0,552	
29	0,515	0,582	
31	0,554	0,596	
35	0,609	0,620	
75	0,775	0,784	

Auch Engel (Hofm. Beitr. **7**, 77; 1905) kommt in einer sorgfältigen Untersuchung mit der gleichen Methodik wie Volhard und Stade an Eigelb-Emulsion und Pankreatin zum Resultat, dass die Schützsche Regel bei der enzymatischen Fettverseifung gilt, dass also bei gleicher Verdauungszeit die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Enzymmengen, und dass bei gleichen Fermentmengen die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Für ein und denselben Saft muss also gelten:

$$x = k\sqrt{Et}.$$

Dies ist auch der Fall.

	4 Stunden			9 Stunden			25 Stunden			
Pankreatin	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{E\,t}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{E\,t}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{E\,t}}$	
0,04 g	17,6	16,8	4,4	18,4	24,5	3,1	35,0	38,3	3,5	Temp. 41°
0,09 g	20,9	24,5	3,5	36,3	35,0	4,0	58,2	53,0	3,8	
0,16 g	35,2	31,6	4,4	48,4	44,6	4,0	72,1	65,0	3,6	

Die Berechnung der Werte $x_{ber.}$ ist nach der Arrheniusschen Formel mit der Konstante $\varkappa = 1{,}0$ ausgeführt worden. Die Versuchsfehler sind, wie man sieht, nicht unerheblich; trotzdem ist deutlich, dass die Zahlen der Schützschen Regel folgen.

Versuche, welche Zellner (Monatsh. f. Chemie **26**; 1905) mit Lipase aus Fliegenpilz angestellt hat, sind von Kanitz berechnet worden. Die Resultate waren wechselnd; in zwei Versuchsreihen waren die Quotienten $\frac{x}{t}$ konstant, in einer andern der Ausdruck $\frac{x}{\sqrt{t}}$.

Euler (Hofm. Beitr. **7**, 1; 1905) spaltete mit Esterasen (aus Fettgeweben des Schweines) Äthylbutyrat in wässeriger Lösung und fand für diesen Fall das Zeitgesetz für monomolekulare Reaktionen erfüllt.

Minuten:	Zur Titration verbrauchte Barytlösung in ccm:	Unverbrauchte Menge:	Monomolekulare Reaktionskonstante:
t	x	a — x	k · 10^4
0	0	2,70	—
2	0,3	2,40	256
6	0,75	1,95	235
9	1,05	1,65	237
16	1,65	1,05	250

Rouge (Zentralbl. f. Bakt. II, **18**; 1907) zieht aus seinen Beobachtungen über die Lipase des Lactarius sanguifluus gleichfalls den Schluss, dass in verdünnten Lösungen die Enzymwirkung der angewandten Enzymmenge direkt proportional ist.

Die mit eigentlichen Lipasen angestellten Versuche beziehen sich alle auf Systeme mit makroskopisch wahrnehmbaren Grenzflächen (Suspensionen), da die meisten Lipasen in Wasser unlöslich sind. Lipolytisch wirksame Glyzerinauszüge lassen sich nach A. Kanitz (H. **40**, 482; 1905) aus Schweinepankreasdrüsen gewinnen. Mit diesen hat Kanitz die Hydrolyse von Olivenöl und Rizinusöl verfolgt.

Je 10 ccm Olivenöl werden in Reagenzgläsern mit 3,9 ccm 0,10 norm. Natronlauge, 0,25 ccm 1 norm. $CaCl_2$ und 1 ccm Lipaseextrakt vermischt und der Inhalt je eines Reagenzglases wird nach der unter t verzeichneten Minutenzahl titriert. Die dabei verbrauchten Kubikcentimeter 0,10 norm. Natronlauge sind unter x angegeben.

t	x	$\frac{x}{t}$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0	0,0	—	—
70	9,2	0,131	1,10
140	12,3	0,088	1,04
288	19,0	0,065	1,12
405	23,1	0,057	1,15
1455	34,2	0,023	0,90

Das Zeitgesetz der pflanzlichen Lipasen ist zuerst von Connstein, Hoyer und Wartenberg (Chem. Ber. **35**, 3988; 1903) untersucht worden. Dieselben haben zunächst die wesentliche Tatsache festgestellt, dass erhebliche Mengen freier Säure notwendig sind, um die Lipase zur Wirksamkeit gelangen zu lassen. Verreibt man nach Sigmunds Vorschrift (Monatsh. f. Chemie **11**, 272; 1890) pulverisierte Rizinus-Samen mit Wasser und überlässt sie während 24 Stunden bei ca. 40° sich selbst, so beobachtet man tatsächlich nach Ablauf dieser Zeit durch Titrieren des Gemenges das Auftreten geringer Mengen Säure; lässt man solche Proben noch mehrere Tage stehen, so erfolgt nach einiger Zeit ein sprungweises rapides Ansteigen der Säuremenge. Dieser „Sprung“ tritt je nach der höheren (35°—40°) oder niedrigeren (15°—20°) Temperatur des Ansatzes bald früher (nach 2—3 Tagen), bald später (nach 4—6 Tagen) in Erscheinung.

5 g Rizinus-Samen mit 5 g 1%iger Chloralhydratlösung verrieben und bei 16° sich selbst überlassen:

Gefunden	sofort	nach 2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	8 Tagen
% Rizinusölsäure	1	3	52	59	59

Wir haben es hier mit einem Fall von Autokatalyse zu tun, wo also eines der Reaktionsprodukte den Fortgang der Reaktion beschleunigt. Über die günstigen Konzentrationen gibt folgender Versuch mit Schwefelsäure Aufschluss:

Normalität:	0,02	0,05	0,10	0,12	0,2	0,5
Gespalten nach 18 Std. in %	25	80	86	84	86	13

In so stark sauren Lösungen ist ausser den Samenlipasen nur noch Pepsin wirksam. Der Gedanke, dass durch die Säure ein in den Samen vorhandenes Proenzym (Zymogen) in ein wirksames Enzym umgewandelt werde, ist nach den genannten Autoren zurückzuweisen, denn wenn man die Samen längere Zeit mit dieser Säure behandelt, und die letztere dann entfernt, so ist in dem zurückbleibenden Samen keinerlei Veränderung zu konstatieren; derselbe wirkt in neutraler Lösung ebensowenig fettspaltend, wie vor der Säurebehandlung, und seine Wirksamkeit kann nur durch erneuten Säurezusatz hervorgerufen werden.

Bei Anwendung verschiedener organischer Säuren fanden H. E. Armstrong und Ormerod (Proc. Roy. Soc. **78**, 378; 1906) mit Rizinuslipase folgende Zahlen:

Konzentration der Säure	0,01 norm.	0,02 norm.	0,10 norm.	0,50 norm.	$k \cdot 10^5$
Essigsäure	5,15	14,9	14,6	13,6	1,8
Bernsteinsäure	2,80	14,6	15,1	12,2	6
Zitronensäure	7,25	15,3	14,7	1,1	82
Weinsäure	6,95	15,1	14,2	—	97

Auch hier findet man also ein ziemlich flaches Maximum. Eine Beziehung zwischen der Stärke der Säuren — die Dissoziationskonstanten sind in der letzten Kolumne angegeben — und dem Grad der Reaktionsbeschleunigung bezw. Enzymaktivierung lässt sich nur schwierig erkennen.

Die Art der zugesetzten Säuren scheint somit ohne erheblichen Einfluss zu sein, was so gedacht werden kann, dass durch sie nur der eigentliche Aktivator, vermutlich selbst eine schwache Säure, freigemacht wird.

Um den Einfluss der Enzymmenge auf die Spaltungsgeschwindigkeit festzustellen, wurden 0,5 g Rizinussamen mit 5, 10, 15, 20, 25 und 50 g Rizinusöl und den gleichen Mengen 2%iger Essigsäure zu Emulsionen verrieben. Nimmt man an, dass die wirksame Masse der Lipase der Gesamtmenge proportional ist, und berechnet die nach gewissen Zeiten hydrolysierten Mengen nach der S. 97 besprochenen Formel:

$$1000 \ln \frac{1000}{1000 - x} - x = \varkappa E t,$$

so erhält man folgende Übereinstimmung, welche nur bei den grössten Mengen nicht befriedigend ist:

0,5 g Rizinussamen wirken auf		1 Tag		2 Tage	
g Öl	g Essigsäurelös.	x beob.	x ber.	x beob.	x ber.
50	50	49	49	49	59
25	25	60	65	74	74
20	20	71	69	80	78
15	15	77	75	87	84
10	10	81	83	86	91
5	5	89	94	92	98
		$\varkappa$ = 186		$\varkappa$ = 300	

Über den zeitlichen Verlauf der Spaltung geben zahlreiche Versuche, unter anderen 26, 28, 38 und 46 Aufschluss. Die beiden letzteren sind folgendermaassen angestellt: 5 g Rizinussamen wurden mit 6,5 g Rizinusöl und 4 g 0,1 n. Schwefelsäure bezw. 4 g Essigsäure verrieben.

Vers. 46.

0,10 n Schwefelsäure		
t Min.	x beob.	x ber.
15	12	20
30	20	27
45	30	32
60	33	36
90	41	43
150	54	53
210	59	59
330	68	69
1620	81	97

$\varkappa E = 1{,}47$

Vers. 38.

0,10 n Essigsäure		
t Std.	x beob.	x ber.
1	52	48,6
2	65	62,8
3	70	71,5
4	72	77,6
24	80	99,5

$\varkappa E = 180$

0,40 n Essigsäure		
t Std.	x beob.	x ber.
1	65	63,9
2	86	78,8
3	84	86,5
4	84	91,2
24	91	99,9

$\varkappa E = 380$

Die Abweichungen der beobachteten Zahlen von den berechneten sind bei längeren Zeiten erheblich. Arrhenius vermutet deshalb, dass hier Gleichgewichte vorliegen. Nicloux (Soc. Biol. **54**, 840; 1902) verdankt man weitere ausführliche Versuche über Rizinus-Lipasen oder, wie dieser Verfasser sagt, über die lipolytische Wirkung des Cytoplasmas von Rizinussamen. Auch Nicloux fand sein Präparat unlöslich in Wasser; er emulgierte das Cytoplasma in dem zu hydrolysierenden Öl, meist Baumwollöl, und setzte verdünnte Essigsäure zu. Folgende Zahlen sind bei 18° erhalten:

t Min.	30	45	60	90	127	150	210	450
Hydrolys. in %	23,6	33,1	40,4	54,8	67,0	73,2	85,5	94,4
$\varkappa\, E = 1000\,(\ln \frac{1000}{1000-x} - x$	1,10	1,58	1,89	2,73	3,45	3,89	5,12	4,31
$k = \frac{100}{t} \log \frac{100}{100-x}$	0,388	0,387	0,375	0,382	0,392	0,381	0,399	0,278

Der Schützschen Regel folgen, wie ersichtlich, die beobachteten Zahlen nicht. Dagegen gibt die für monomolekulare Reaktionen gültige Formel den beobachteten Gang der Hydrolyse ziemlich gut wieder.

Bodenstein und Dietz (Z. f. Elektroch. **12**, 605; 1906. Dietz, H. **52**, 279; 1907), haben gleichfalls ein heterogenes System studiert; Pankreaslipase wurde in Form geschabter Gewebefasern von der Pankreasdrüse des Schweines in Amylalkohol emulgiert, welcher Wasser und Buttersäure bezw. Amylbutyrat gelöst enthielt.

Man erwartet zunächst die Geschwindigkeitsgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k_1\, C_{\text{Säure}} \cdot C_{\text{Alkohol}} - k_2\, C_{\text{Ester}} \cdot C_{\text{Wasser}}$$

wobei sich alle Konzentrationen auf die Enzymphase beziehen. Die Konzentration von Wasser und Alkohol ist annähernd konstant, da durch die Vorgänge stets nur kleine Mengen verschwinden. Andererseits sollen sich die Stoffe zwischen Enzym und Flüssigkeit nach dem Nernstschen Verteilungssatz verteilen, d. h. $C_{\text{Enzym}} = \alpha \cdot C_{\text{Lösung}}$. Die Proportionalitätsfaktoren, wie die konstanten Konzentrationen von Alkohol und Wasser gehen in die Konstanten ein, und man erhält daher:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 C_{\text{Säure}} - k_2 C_{\text{Ester}} = k_1\,(a-x) - k_2\, x.$$

Löst man nur wenig Wasser in Amylalkohol, so wird die Gegenreaktion sehr klein, und der Vorgang verläuft einfach nach:

$$\frac{dx}{dt} = k\,(a-x)$$

wie folgende Tabelle erkennen lässt:

a = 0,10 normal

	4% H_2O			2% H_2O	
t Stunden	Titer v. 5 ccm	k	t Stunden	Titer v. 5 ccm	k
0,00	13,55	—	0,00	13,55	—
2,00	12,75	0,013	2,50	13,15	0,0064
5,53	11,90	0,010	9,57	11,80	0,0062
10,33	10,35	0,012	14,35	10,95	0,0064
15,17	9,15	0,012	24,45	9,45	0,0063
25,20	7,05	0,012	31,88	8,45	0,0063
32,58	5,85	0,012	47,89	6,55	0,0065
48,83	4,25	0,012	55,27	5,90	0,0064
55,92	3,90	0,011	76,67	4,60	0,0060
77,73	3,00	0,010	100,42	3,25	0,0062
308,00	1,50	—	308,00	1,10	—

Geht man zu höheren Wassergehalten über, so stellt sich ein von beiden Seiten erreichbarer Endzustand ein, und es wird die Geschwindigkeit der beiden entgegengesetzten Reaktionen messbar. Einen solchen Fall gibt die folgende Tabelle wieder.

	Esterbildung			Esterhydrolyse	
t Stunden	Titer v. 5 ccm	k_1	t Stunden	Titer v. 5 ccm	k_2
0,00	13,40	—	0,00	0,00	—
1,98	12,60	0,014	3,63	0,75	0,0075
4,00	11,82	0,014	7,60	1,45	0,0077
6,98	10,80	0,014	16,77	2,35	0,0064
11,55	9,10	0,016	24,05	2,95	0,0070
14,98	8,40	0,016	89,30	4,20	
25,10	6,55	0,016			
96,95	4,25				
	Mittel	0,015		Mittel	0,0072

Beide Konstanten verdoppeln sich annähernd, wenn die Enzymmenge verdoppelt wird.

Enzymmenge	Konstanten	
	k_1	k_2
1	0,015	0,0072
2	0,028	0,014

Auch A. E. Taylor, welcher Triacetin, den Essigsäureester des Glyzerins, mit dem Pulver von Rizinus-Bohnen hydrolysiert hat, fand einen Reaktionsverlauf, wie bei monomolekularen Reaktionen. Er gibt folgende Resultate an, bei welchen 1/2, 1 und 2%ige Lösungen von Triacetin zur Anwendung kamen. Die Konstanten k beziehen sich auf 18°.

	t Stunden	4	8	16	24	28	32	40	48
1/2%	x beob.	0,096	0,162	0,287	0,418	0,489	0,477	0,623	0,652
	k	109	96	92	98	104	88	106	96
1%	x beob.	0,083	0,174	0,338	0,418	0,488	0,542	0,609	0,655
	k	94	104	112	98	104	106	102	96
2%	x beob.	0,098	0,174	0,323	0,431	0,502	0,485	0,595	0,636
	k	112	104	106	102	108	90	98	91

Wie es kommt, dass bei allen diesen Versuchen die hydrolysierte Menge Fett nach dem einfachsten Zeitgesetz, welches für homogene Systeme gilt, berechnet werden kann, lässt sich wohl nicht ganz überblicken. Es ist bei der Hydrolyse von Fetten und Triacetin um so auffallender, als wir ja hier drei stufenweise verlaufende Hydrolysen haben, welche wohl mit verschiedener Geschwindigkeit stattfinden.

Amylase.

Zu den Schwierigkeiten, welche die wechselnden Verunreinigungen der Enzyme verursachen, kommt bei den Versuchen mit Diastase (Amylase) noch oft die Komplikation, die ein nicht einheitliches Substrat mit sich bringt. Wie besonders durch die Versuche von Maquenne festgestellt ist, besteht Stärke im wesentlichen aus zwei Komponenten, nämlich 80—85% Amylose und 15—20% Amylopektin. Amylose liefert nie Kleister, wird in Lösung durch Jod intensiv blau gefärbt und von Malzdiastase nur in Lösung angegriffen. Es besteht eine Kondensationsreihe von in Wasser verschieden löslichen Gliedern, welche in Amylose gipfelt; besonders die niederen Glieder sind in „löslicher Stärke“ reichlich vorhanden. Bei der Verzuckerung reiner Amylose wird ausschliesslich Maltose gebildet. Amylopektin ist eine gallertartige, in Wasser und Alkalien unlösliche Substanz, welche bei der Hydrolyse ausser Maltose (?) noch Dextrin liefert. Ob dies durch die Amylase oder durch eine spezielle Amylopektinase geschieht, ist noch nicht sicher; immerhin ist letzteres wahrscheinlich. Jedenfalls wird man bei quantitativen Versuchen mit Amylase künftig möglichst reine Amylose, wenigstens aber „lösliche Stärke“ anwenden. Zur technischen Diastasebestimmung behandelt man Kartoffelstärke nach Lintners Vorschrift (siehe Anhang).

Was die Spaltungskurve betrifft, so stimmen Versuche verschiedener Autoren nicht besonders gut miteinander überein. Die ältesten Versuche, von H. Brown und Glendinning (J. Chem. Soc. **81**, 388; 1902), mit Malzextrakt schliessen sich nämlich der einfachen logarithmischen Kurve nicht an. Besser werden sie durch die Formel

$$\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x} = k_H$$

wiedergegeben, wie folgende Zahlen zeigen:

3%ige Stärkelösung mit 0,25 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung:

Minuten	x	$k \cdot 10^5$	$k_H \cdot 10^5$	Temp. 51—52°
10	0,1084	498	472	
20	0,2250	553	497	
40	0,4350	620	506	
60	0,6150	690	518	
80	0,7385	728	514	
100	0,8150	732	495	
120	0,8800	762	497	
140	0,9220	791	497	
160	0,9500	813	492	

3 %ige Stärkelösung mit 1 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung:

10	0,081	366	352	Temp. 21°
20	0,163	386	357	
40	0,308	399	345	
60	0,440	419	341	
70	0,506	437	345	

Versuche von Henri (Lois générales etc.) folgen dagegen der logarithmischen Kurve. Ob die Methodik (Bestimmung der Änderung des Reduktionsvermögens) einwandfrei ist, hängt von der Reinheit der angewandten Amylase ab.

Ebenso hat A. E. Taylor mit Speicheldiastase folgende Werte erhalten:

Substrat 1/4 %								
t Minuten	30	45	60	75	90	120	150	180
k (x 10−6)	490	465	455	470	465	455	460	455
Substrat 1/2 %								
k (x 10−6)	430	420	390	415	405	395	430	410
Substrat 3/4 %								
k (x 10−6)	390	370	385	390	380	370	365	370

Wie Taylor hervorhebt, variieren die Werte von k stark mit der Konzentration des Substrates.

Was die Abhängigkeit von der Konzentration der Amylase betrifft, so fand Henri an einem Pflanzenpräparat Proportionalität zwischen der Enzymkonzentration und der pro Zeiteinheit gespaltenen Stärkemenge.

Zum gleichen Resultat kam Taylor mit Speicheldiastase. Brown und Glendinning (J. Chem. Soc. **81**, 381; 1902) hingegen fanden die Reaktionsgeschwindigkeit proportional mit der Quadratwurzel aus der Konzentration der Speicheldiastase und Klempin (Biochem. Z. **10**, 206; 1908) schliesst aus einigen Versuchen mit Haferdiastase, dass für dieses Enzym die Schützsche Regel $E\sqrt{t} = x$ gilt.

Die von Pawlow (Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898) angegebenen Versuche, welche mit Mettschen Kapillaren ausgeführt sind, können, so interessant sie an und für sich sind, kaum über den Verlauf der Verzuckerung der Stärke etwas aussagen, da es sich dabei um die Verflüssigung des Kleisters handelt und da die Diffusionsgeschwindigkeit einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Geschwindigkeit des Vorgangs ausübt.

Aktivatoren und Hemmungskörper. Folgende Stoffe begünstigen die Stärkespaltung: Salze des Vanadiums und Aluminiums, Phosphate des Ammoniums und Calciums, Asparagin, Aminosäuren, Eiweisskörper und Pikrinsäure (Effront, Die Diastasen S. 126; Soc. Biol. **57**, 234; 1904. — Allg. Brauer- u. Hopfenztg. **45**; 1905). Die Beschleunigungen sind teilweise sehr erheblich; so wurde durch einen Zusatz von 0,05 g Asparagin zu 100 ccm Amylasehaltiger Stärkelösung die Geschwindigkeit versiebenfacht. Auch Kohlensäure fördert, besonders unter erhöhtem Druck (Detmer, Müller-Thurgau).

Das Wirkungsoptimum pflanzlicher Diastasen scheint bei geringem Überschuss an H-Ionen einzutreten (kleine Mengen organischer Säuren); OH-Ionen hemmen die Hydrolyse schon in

geringster Menge, jedoch wird die Inaktivierung aufgehoben, sobald das Alkali neutralisiert wird. Das Temperaturoptimum (gemessen von Kjeldahl durch die reduzierende Kraft der Spaltprodukte) ist 63°.

Invertase.

Auf die Rohrzuckerspaltung durch Invertase beziehen sich zahlreiche quantitative Arbeiten, von denen in erster Linie die bereits 1890 von O'Sullivan und Tompson ausgeführte (J. Chem. Soc. **57**, 834; 1890) zu nennen ist. Diese Forscher wiesen zunächst nach, dass hier wirklich eine katalytische Reaktion vorliegt, und fanden sodann dieselbe monomolekular. Dieses Ergebnis wurde später von Duclaux (Traité de Microbiologie, Vol. 2, 129) bestritten, und ebenso kam Henri (Z. physik. Chem. **39**, 194; 1902) zu einer anderen als der monomolekularen Formel, nämlich zum Ausdruck (vergl. S. 92)

$$2\,k_H = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$$

welchem sich seine Versuchsdaten leidlich gut anschliessen. Später hat dann Bodenstein seine S. 92 erwähnte kompliziertere Formel aufgestellt und endlich gelangte Henri (Thèses S. 92) zu folgender Gleichung:

$$k_B = \frac{a}{t}\left[(m-n)\frac{x}{a} + \log \frac{a}{a-x}\right] + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

welche er durch Integration der Differentialgleichung (12) S. 94 erhielt. Wie schon erwähnt, hat es sich neuerdings herausgestellt, dass die Versuchsdaten von Henri und auch diejenigen seiner Mitarbeiter durch die Multirotation der Glukose stark beeinflusst sind, und also über den zeitlichen Verlauf der Glukosespaltung direkt nichts aussagen. Es ist ein grosses Verdienst von Hudson (J. Amer. Chem. Soc. **30**, 1160 und 1564; 1908) nicht nur die Zuverlässigkeit der Angaben von O'Sullivan und Tompson sicher gestellt, sondern auch die Untersuchung dieser Forscher fortgeführt und wesentlich erweitert zu haben.

Schon O'Sullivan und Tompson hatten richtig erkannt, dass Glukose, wenn sie aus dem Rohrzucker durch Inversion entsteht, sich zunächst im Zustande der Birotation befindet, und dass deswegen die optische Aktivität einer Lösung, welche enzymatisch invertiert wird, kein Maass für den Fortschritt der Reaktion abgibt. Sie haben deswegen die Proben, welche sie in bestimmten Zeitintervallen ihren Lösungen entnommen haben, vor der polarimetrischen Ablesung mit wenig Alkali versetzt, wodurch bekanntlich die Multirotation fast augenblicklich aufgehoben wird. Aus ihren Angaben geht hervor, dass die so angestellten Versuche zu monomolekularen Formeln führen, dass hingegen die Konstanten stark ansteigen, wenn die genannte Vorsichtsmaassregel nicht angewandt wird. Ich führe zunächst ihre Zahlen an:

	Drehung		$k = \frac{1}{x} \ln \frac{a}{a-x}$	
Minuten	ohne Alkali	mit Alkali	ohne Alkali	mit Alkali
0	74,5°	69,4°	—	—
37	57,9	37,6	0,0021	0,0046
152	0,6	— 20,4	0,0037	0,0074
268	— 19,1	— 24,8	0,0041	0,0058
∞	— 27,8	— 27,8	—	—

Allerdings lässt die Konstanz der letzten Spalte zu wünschen übrig, und es mögen deswegen auch folgende Zahlen von Hudson hier Platz finden.

	Drehung		$10^5\, k = \frac{10^5}{t} \log \frac{a}{a-x}$	
Minuten	ohne Alkali	mit Alkali	ohne Alkali	mit Alkali
0	24,50	24,50	—	—
30	16,85	14,27	396	558
60	10,95	7,90	399	530
90	4,75	3,00	464	539
110	1,95	0,80	482	534
130	— 0,55	— 1,49	511	559
150	— 2,20	— 2,40	522	533
∞	— 7,47	— 7,47	—	—

Die Werte von k sind, wie man aus dieser Tabelle und aus anderen von Hudson gegebenen ersieht, konstant. Über den Einfluss der H·-Konzentration auf diese Konstanz siehe Sörensen (Biochem. Z. **21**), welcher folgende sehr gute Konstanz der k-Werte fand.

Konzentration der Wasserstoffionen: $10^{-3,92}$. Temperatur: 52°.

Anfangsdrehung: $a_1 = 6,62$. — Enddrehung: $6,62 \times 1,313 = 8,692$.

Nach Zugabe der Enzymlösung verflossene Minuten t	Zur Zeit t beobachtete Drehungsänderung in Graden; x	$\frac{x}{A}$	$k \cdot 10^4$
2	0,54	0,0621	
17	3,44	0,3958	127
32	5,30	0,6098	127
47	6,54	0,7524	132
62	7,34	0,8445	135
92	8,21	0,9445	149
122	8,49	0,9768	126

Dass andere Experimentatoren keine Übereinstimmung mit dem Massenwirkungsgesetz finden konnten, kann also nicht allein auf dem Einfluss der nicht aufgehobenen Multirotation des Rohrzuckers beruht haben. So haben z. B. H. E. Armstrong und Glover, welche die Wirkung von Invertase auf Rohrzucker und auf Raffinose vergleichen wollten (Proc. Roy. Soc. **80**, 312; 1908), ihre Zuckerlösungen vor den Ablesungen im Polarimeter alkalisch gemacht, trotzdem aber keine bessere Konstanz erhalten als die in der linken Hälfte der Tabelle stehenden Zahlen zeigen:

Minuten	34,2 g Rohrzucker + 4 ccm Invertase-Extrakt per 1000 ccm Hydrolysiert in %	$k \cdot 10^5$	59,1 g Raffinose + 4 ccm Invertase-Extrakt per 1000 ccm Hydrolysiert in %	$k \cdot 10^5$
0	0,0	—	0,0	—
5	8,3	753	1,8	157
15	25,9	868	5,9	176
25	39,5	865	13,1	249
40	62,1	1062	20,1	243
60	78,2	1102	29,3	251
95	91,1	1106	41,6	246
140	93,7	859	53,1	237
200	95,1	656	66,6	238
260	96,0	537	77,9	252
∞	100,0			

Wie die obige Tabelle zeigt, spaltet Invertase den Rohrzucker etwa 4 mal schneller in Fruktose und Glukose, als dieses Enzym die Raffinose in Fruktose und Melibiose zerlegt.

Auch hinsichtlich der übrigen Bedingungen der Invertasewirkung stützen sich unsere Kenntnisse auf die Arbeiten von O'Sullivan und Tompson und von Hudson, welche neuerdings auch von Taylor (Journ. of Biol. Chem. **5**, 405; 1909) bestätigt werden. Die Angaben der erstgenannten Autoren über die Proportionalität zwischen der Inversionsgeschwindigkeit und der Enzymkonzentration finden nämlich durch Hudsons Resultate ihre volle Bestätigung.

Wir finden bei O'Sullivan und Tompson folgende Tabelle (l. c. S. 848).

Temp.	Invertase-Präparat g	$^1/_2$ H_2SO_4 normal	Reaktionszeiten Anfang	Ende	Ablesung im 2 dm-Rohr	Minuten bis zur Drehung 0° A gef.	B ber.
15,5	0,15	0,00187	11^{40}	4^{41}	— 2,0	283,0	291.
15,5	0,45	0,0031	3^{00}	4^{40}	— 1,8	94,8	96,3
15,5	1,50	0,0050	11^{56}	12^{26}	+ 1,0	30,7	29,1
56,5	0,0345	0,00025	11^{00}	12^{43}	+ 16,5	157,6	157,1
56,5	0,0722	0,000375	11^{22}	12^{15}	+ 13,5	74,8	75,1

Die dritte Spalte gibt die Acidität der Lösung an. Durch Vorversuche waren die betr. Konzentrationen als die für die Reaktionsgeschwindigkeit günstigsten ermittelt worden. In der vorletzten mit A bezeichneten Spalte sind die Zeiten angegeben, welche bis zum Eintritt der Drehung 0° verflossen sind, und in der Spalte $B_{ber.}$ die Zeit, welche sich unter der Annahme der Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit ergeben.

Auch bei Veränderung der Zuckerkonzentration scheint nach den Versuchen von O'Sullivan und Tompson in recht weiten Grenzen die Forderung der Theorie erfüllt zu sein, d. h. es werden durch ein und dieselbe Enzymmenge in gleichen Zeiten gleiche Anteile des Zuckers gespalten, welches auch seine Konzentration ist.

Andererseits gibt allerdings A. Brown (J. Chem. Soc. 81, 373; 1902) Zahlen an, nach welchen eine gegebene Enzymquantität die gleiche absolute Zuckermenge invertiert.

g Rohrzucker in 100 ccm	g Rohrzucker invertiert in 60 Min.	% Rohrzucker invertiert in 60 Min.
4,89	1,230	25,2
9,85	1,355	13,8
19,91	1,355	6,8
29,96	1,235	4,1
40,02	1,076	2,7

In verdünnten Zuckerlösungen andererseits, wenn die Lösungen relativ viel Enzym enthielten, soll auch nach Brown die Wirkung einer gegebenen Enzymquantität der Zuckerkonzentration proportional sein.

g Rohrzucker in 100 ccm	g Rohrzucker invertiert in 60 Min.	$10^5\,k = \frac{10^5}{t} \log \frac{a}{a-x}$
(2,0)	(0,308)	(132)
1,0	0,249	219
0,5	0,129	239
0,25	0,060	228

Hudson stellt seine Resultate in folgender Tabelle zusammen:

Einfluss der Konzentration der Invertase auf die Inversionsgeschwindigkeit bei 30°.

Konzentration der Invertase	Minuten	Produkt	Invertierter Zucker in % bei verschied. Rohrzuckermengen pro Liter		
E	t	E · t	45,5 $\frac{g}{Liter}$	90,9 $\frac{g}{Liter}$	273 $\frac{g}{Liter}$
2,00	15	30	73,2	45,3	11,2
2,00	30	60	93,0	74,2	22,0
1,50	20	30	73,2	44,8	11,2
1,50	40	60	92,8	74,5	22,7
1,00	30	30	72,9	45,3	11,5
1,00	60	60	93,0	74,7	22,3
0,50	60	30	72,9	45,2	11,4
0,50	120	60	92,7	74,5	22,6
0,25	120	30	73,1	45,2	10,9
0,25	240	60	92,7	74,7	21,9

Die Ergebnisse sind also folgende:

1. Strenge Proportionalität zwischen der pro Zeiteinheit invertierten Zuckermenge und der Enzymkonzentration.
2. Unabhängigkeit der Inversionsgeschwindigkeit von der Zuckerkonzentration innerhalb recht weiter Grenzen, wie es für monomolekulare Reaktionen zu erwarten ist.

Mit seiner, wie wir gesehen haben, fehlerhaften Methodik hat Henri eine Beziehung gefunden, die aus folgender Tabelle hervorgeht. Es bedeutet n die Anzahl der Milligramme, die nach der ersten Minute in einer c-normalen Rohrzuckerlösung invertiert waren:

n	0,58	1,41	2,10	2,96	4,65	5,61	4,45	2,82	1,15
c	0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00

Abgesehen davon, dass Hudsons Untersuchung wieder eine einwandfreie Methode geschaffen hat, bietet auch das Ergebnis, dass aus dem Rohrzucker zunächst α-Glukose entsteht, nicht wenig Interesse. (Auf die sich hieraus ergebenden Konsequenzen in bezug auf die enzymatischen Synthesen der Disaccharide werden wir noch zurückkommen.) Wir entnehmen hierüber der erwähnten Arbeit noch folgendes:

Aus Rohrzucker entsteht nicht nur Glukose sondern auch Fruktose in einer labilen (durch grosses Drehvermögen ausgezeichneten) Form. Indessen verläuft der Rückgang der Multirotation — gemessen bei 30° — bei der Fruktose (Reaktionskonstante $k = 0{,}186$) etwa 11 mal schneller als bei der Glukose ($k = 0{,}0167$). Gelöste Invertasepräparate haben keinerlei Einfluss auf diese Geschwindigkeitskonstanten. In einer in enzymatischer Spaltung befindlichen Rohrzuckerlösung kann also die Differenz zwischen dem scheinbaren und dem wirklichen Spaltungsgrad fast nur von der Drehungsänderung der Glukose herrühren. Kann man durch eine sehr aktive Invertase eine Rohrzuckerlösung fast augenblicklich invertieren, so muss jede in der Lösung stattfindende weitere Drehungsänderung ziemlich vollständig der Multirotation der Glukose zugeschrieben werden, und die Geschwindigkeit dieses Vorganges muss mit der Geschwindigkeit des für reine Glukose ermittelten Drehungsrückganges nahe zusammenfallen. Dies hat sich nun wirklich bestätigt.

Zur Anwendung kam eine so kräftige Invertaselösung, dass innerhalb einer halben Minute 72 % des Rohrzuckers invertiert waren. Die Endrotation wurde nach Zusatz von etwas Natronlauge bestimmt.

Minuten	Drehung ohne Alkali	$\frac{10^3}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Minuten	$\frac{10^3}{t} \log \frac{a}{a-x}$
0	33,50	—	—	—
3	11,88	99	—	
4	7,32	99	—	
5	4,77	93	—	
9	— 0,35	72	—	
10	— 1,35	69	—	
13	— 3,57	63	0	Anfang
16	— 4,90	57	3	32,3
19	— 6,03	54	6	33,4
23	— 7,15	50	10	33,6
29	— 7,92	44	16	28,7
30	— 8,22	45	17	30,7
∞	— 10,22	—	—	—
				31,7

Für den Rückgang der Multirotation der Glukose wurde in einer gleich konzentrierten Invertaselösung die Geschwindigkeitskonstante $k\,10^3 = 29{,}9$ ermittelt, was mit obigem Ergebnis $k\,10^3 = 31{,}7$ gewiss gut übereinstimmt.

Wir sind auf die ausgezeichnete Untersuchung von Hudson deswegen ausführlich eingegangen, weil die an Invertase gewonnenen Ergebnisse auch für die Beurteilung der enzymatischen Spaltungen der übrigen Disaccharide und der Glukoside wichtig ist, denn auch bei den vorliegenden Untersuchungen der anderen Disaccharide werden sich die Multirotationen der Hexosen als Fehlerquellen mehr oder weniger geltend gemacht haben.

Auf die starke Beschleunigung, welche die enzymatische Inversion durch Säuren erleidet, wurde schon früher hingewiesen.

Bereits O'Sullivan und Tompson fanden, dass Invertase kleinen Säurezusätzen gegenüber sehr empfindlich ist. Auch diese Beobachtungen sind von Hudson (l. c.) bestätigt worden. Seiner Arbeit entnehmen wir, dass bereits in einer ca. 0,0006 norm. Salzsäure ein Optimum der Invertasewirkung eintritt. Sörensen, welcher den Einfluss der Acidität auf Enzymreaktionen sehr eingehend untersucht hat (Biochem. Z. **21**), findet für Invertin die optimale Konzentration der Wasserstoffionen $10^{-4,4}$—$10^{-4,6}$. Sehr schwache Säuren, wie Kohlensäure beschleunigen demgemäss.

Die geringsten Mengen überschüssiger OH-Ionen bringen die Reaktion schon zum Stillstand.

Verhältnismässig wenig empfindlich ist das Enzym gegen starke Gifte und Antiseptika, wie Sublimat und Chloroform.

Als Temperaturoptimum wird 50—60° angegeben. Die Inaktivierungskonstante der Invertase aus einer Hefe vom Frohberg-Typus wurde bei 60° und bei einer H'-Konzentration von 10^{-6} in der wässerigen Lösung zu 0,01 bestimmt (af Ugglas, H. **65**).

Maltase.

Wie beim Emulsin fand E. F. Armstrong (Proc. Roy. Soc. **73**, 508; 1904) bei Maltase, dass die Reaktionskonstanten 1. Ordnung stark abnehmen.

Maltose 5%			Maltose 10%		
Stunden	x	$k \cdot 10^4$	Stunden	x	$k \cdot 10^4$
1	7,3	329	1	4,7	209
2	13,9	325	3	11,7	180
4	24,4	304	5	17,8	170
7,25	31,7	229	23	23,9	52
23	35,2	82	28	25,0	45
			47	31,4	35

Im auffallendsten Gegensatz hierzu stehen die Zahlen von Henri und Mlle. Philoche (Soc. Biol. **57**, 171; 1904), sowie von Henri und von Terroine (Archivio di Fisiologia **2**, I; 1904), nach welchen die Konstanten k der monomolekularen Reaktion anfangs steigen, während die Konstanten k_H für eine bestimmte Anfangskonzentration relativ konstant sind.

Terroine (l. c. S. 4)
Maltose 4 %

Min.	$k \cdot 10^5$	$2 \cdot k_H \cdot 10^5$
50	88	167
112	86	156
175	103	170
230	127	202
349	119	176
470	134	184
588	122	166
780	113	148
903	106	148

Philoche (l. c. S. 6)
Maltose 4 %

Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^5$
63	0,176	134
120	0,312	135
181	0,441	139
241	0,588	163
363	0,753	167
480	0,824	157
600	0,859	142
750	0,869	117
930	0,900	107

Indessen variieren die Konstanten mit der Verdünnung der Maltase, so dass Henri zunächst die Berechnung nach der Formel (3) S. 92 versucht ($m = 3$, $n = 1$), und da die Übereinstimmung mit den Versuchsdaten nicht befriedigend ist, die Einführung einer neuen Konstante in diese Formel vorschlägt.

Wiederum andere Resultate hat Herzog erhalten (Zeitschr. f. allg. Physiologie **4**, 177; 1904), welcher dieselben nach der Formel (1e) S. 92 mit wechselnden Koeffizienten berechnet.

Maltose 3,67 % $\varepsilon = 1{,}12$

Minuten	$\frac{x}{a}$	k	$k_1 (1-\varepsilon) 10^5$
30	0,128	195	27
60	0,215	175	23
120	0,328	144	22
180	0,415	127	22
240	0,471	115	20
370	0,567	76	21
590	0,631	73	20
620	0,687	81	22

Maltose 3,217 % $\varepsilon = 2$

Minuten	$\frac{x}{a}$	k	$k_1 (1-\varepsilon) 10^5$
20	0,066	149	16
40	0,138	161	19
80	0,193	116	15
120	0,248	103	14
180	0,312	90	15
240	0,358	80	15

Temperaturoptimum nach Hill sowie Lintner und Kröber (Chem. Ber. **28**) bei 40°. Aspergillus-Maltase ist nach Hérissey (Soc. Biol. **48**, 915; 1896) wenig empfindlich gegen Chloroform. Für Hefemaltase empfiehlt Fischer Toluol.

Laktase.

Quantitative Messungen hat E. F. Armstrong (Proc. Roy. Soc. **73**, 506; 1904) ausgeführt.

Bei den verschiedenen Versuchsreihen sinkt die Reaktionskonstante 1. Ordnung durchgehend stark, aber nicht gleichmässig. Als Beispiele hierfür dienen folgende Tabellen:

I 2 g Milchzucker per 100 ccm			II		
100 ccm Enzym-Extrakt			40 ccm Enzym-Extrakt		
Stunden	x	$k \cdot 10^4$	Stunden	x	$k \cdot 10^4$
1	22,1	1085	0,33	3,2	423
2	31,2	812	0,66	6,4	430
3	38,9	713	1	9,6	438
4	45,8	665	1,5	13,2	410
5	51,5	629	2	16,4	389
6	56,6	664	3	20,8	338
10	69,0	509	5	25,2	252
17	84,2	471	23	47,6	122
23	92,4	461	100	89,6	82

Der Gang der Konstanten ist offenbar vom Konzentrationsverhältnis Enzym: Substrat abhängig. Bei relativ grosser Enzymmenge fällt die Konstante kontinuierlich; ist weniger Enzym zugegen, so werden anfangs in gleichen Zeitintervallen gleiche Zuckermengen gespalten.

Die folgende Tabelle zeigt den Einfluss der Laktase-Konzentration auf die Spaltungsgeschwindigkeit einer 5%igen Milchzuckerlösung; sie gibt die gespaltenen Zuckermengen in Prozenten an.

ccm Laktase	1,5 Stunden	20 Stunden	25 Stunden	45 Stunden	68 Stunden
1,0	0,15	2,2	2,6	3,9	4,8
2,5	0,4	5,8	6,8	10,2	12,6
10	1,6	23,3	—	38,6	48,5
20	3,2	45,8	54,5	—	—

Die pro Zeiteinheit hydrolysierten Quantitäten sind den Enzymkonzentrationen, solange diese nicht sehr gross sind, angenähert proportional. Sehr kleine Enzymmengen vermochten nur, wie die nächste Tabelle zeigt, eine geringe Zuckermenge zu spalten; dann hörte ihre Wirksamkeit auf, was so gedeutet wird, dass die Spaltungsprodukte, Glukose und Galaktose, das Enzym binden, und es dadurch der Reaktion mit dem Substrat entziehen.

5%ige Milchzuckerlösung; gespaltene Menge in Prozenten:		
ccm Laktase	24 Stunden	144 Stunden
0,66	2,3	2,3
1,0	3,2	3,5
2,0	6,3	7,4
5,0	15,4	34,0

Variiert man die Milchzuckermenge, so findet man, wenn relativ viel Enzym zugegen ist, Proportionalität zwischen den Zuckerkonzentrationen und den in der Zeiteinheit gespaltenen Mengen, also gleiche Werte für die Reaktionskonstante k.

Milchzucker in 100 ccm	Gespaltene Milchzuckermengen in Prozenten: Gespalten nach 3 Stunden	$k \cdot 10^4$
1,0 g	0,185	296
0,5 g	0,098	298
0,2 g	0,0416	337

Für relativ grosse Substratmengen wird die prozentische Menge gespaltenen Zuckers umgekehrt proportional der Zuckerkonzentration, so dass also in der Zeiteinheit gleiche absolute Mengen Zucker gespalten werden, welches auch seine Konzentration ist.

Wie Invertase und Maltase zeigt Laktase ein Wirkungs-Optimum in schwach saurer Lösung; dasselbe liegt nach Bierry und Salazar (C. r. **139**, 381; 1904) bei einer HCl-Konzentration von 0,02—0,04 ‰, was einer $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration von etwa 10^{-3} entspricht. Milchsäure zeigt nach Bokorny (Malys Jahrb. **33**; 1903) einen spezifisch begünstigenden Einfluss.

Emulsin.

Die ersten quantitativen Versuche über Emulsin hat wohl Tammann angestellt (H. **16**, 298 u. ff.; 1891), welcher die Wirkung dieses Enzyms auf Amygdalin, Salicin, Arbutin und Coniferin untersuchte. Bei 25° scheint der Prozess monomolekular zu verlaufen, wie folgender Vergleich der beobachteten und berechneten Werte von (a — x) zeigt (vergl. Arrhenius, Immunochemie, S. 32).

Zersetzung von Salicin durch Emulsin.

t Stunden	a — x gef.	ber.	k
1	87	88	0,061
3	68	67	0,057
5	42	52	0,075
8	35	35	0,058
12	24	21	0,052
26	9	3	0,040

Stärker sinken die Konstanten bei einer von Armstrong mit Milchzucker angestellten Versuchsreihe (Proc. Roy. Soc. **73**, 507; 1904).

2 g Milchzucker, 0,2 g Emulsin } in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0,5	3,2	282	4,5
1	4,8	214	4,8
2	6,4	143	4,5
3	7,6	114	4,4
4,5	9,0	91	4,2
6	10,0	91	4,1
23	19,7	41	4,1
29	22,0	37	4,1
48	29,0	31	4,2
53	30,7	30	4,2
144	62,2	29	5,2
264	77,5	24	4,8

2 g Milchzucker, 0,4 g Emulsin } in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
1	4,9	218	4,9
2	7,5	169	5,3
4,5	9,4	95	4,4
6	10,6	81	4,3
23	30,5	69	2,0
29	35,0	64	2,0
48	47,8	59	2,2
53	50,0	57	2,2
144	84,0	55	7,0

Eine einfache Beziehung zwischen Reaktionszeit und umgesetzter Menge habe ich diesen Zahlen nicht entnehmen können; ebensowenig geht aus den in der erwähnten Arbeit gegebenen Tabellen eine einfache Beziehung zwischen der Geschwindigkeit der Reaktion und der Enzymkonzentration hervor.

Dass die Konstanten fallen, lässt sich durch den verzögernden Einfluss der Reaktionsprodukte erklären. Um so auffallender ist es, dass die von Auld (J. Chem. Soc. **93**, 1251; 1908) erhaltenen Konstanten den entgegengesetzten Gang zeigen:

300 ccm 2%iger Amygdalinlösung + 15 ccm 2%iger Emulsinlösung.

Minuten	x	$k . 10^5$
10	6,1	255
80	45,2	295
100	54,9	309
150	75,3	347
1360	93,3	

Bei den Versuchen des gleichen Forschers über die Spaltung des Salicins durch ein in Phaseolus lunatus enthaltenes Emulsin (Phaseolunatase) kann man vielleicht von einer Konstanz der k-Werte sprechen[1]) (Tabelle III).

Hydrolyse des Salicins durch Phaseolunatase Temp.: 39,5°	Stunden	x	k
	0,5	15,8	141
	1	30,9	145
	2	59,0	156
	3	68,7	147

Neuerdings haben nun H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, welche zu der Ansicht gekommen sind, dass Emulsinpräparate aus Mandeln wenigstens drei Enzyme enthalten (nämlich eine Gluko-Laktase, eine β-Glukase und eine Amygdalase), einen etwas besseren Anschluss an das

---

[1]) Herzog hat einige Versuche über die Salicinspaltung durch Emulsin ausgeführt (K. Akad. v. Wetensch. Sitzungsber. Amsterdam 1903 und Zeitschr. f. allgem. Physiol. **4**, 163; 1904).

Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^5$	$k_H = \frac{10^4}{t} \log \frac{a - \varepsilon x}{a - x}$	Temp. 25°
24	0,174	346	15	Konz.: 0,07 norm. Salicinlös.
54	0,354	351	16	$\varepsilon = 0{,}6$
86	0,450	302	14	
210	0,691	243	13	
270	0,775	239	14	
371	0,847	219	14	

Massenwirkungsgesetz gefunden, wenn sie mit grösseren Mengen Mandelextrakt, also viel Enzym arbeiteten (Proc. Roy. Soc. **80**, S. 326; 1908).

Stunden	40 ccm Enzymlösung		60 ccm Enzymlösung	
	x	$k \cdot 10^4$	x	$k \cdot 10^4$
2	15,2	358	18,5	444
3	18,5	296	22,7	373
5	21,1	251	36,5	394
7	33,5	253	44,9	380
9	42,2	264	52,5	360
10	44,0	252	53,5	332
24	73,4	240	76,0	258

Wie die dritte und fünfte Kolonne angibt, wurde auch bei diesen Versuchen keineswegs durchgehende Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Geschwindigkeit gefunden; nur relativ kleine Enzymmengen hydrolysierten ihrer Konzentration proportional.

Enzymmenge:	10	20	40	60 ccm
Geschwindigkeits-Konstante $k \cdot 10^4$:	107	212	279	385

Ähnlich sind die Resultate von Auld (l. c. S. 1268).

Enzymmenge:	2	3	4	6	12	25	50 ccm
Nach 10 Minuten hydrolysiert in %:	3,7	6,05	8,7	12,5	17,2	21,6	24,1

Arbeitet man mit verdünnten Amygdalinlösungen, so wird die Konstante von der Konzentration des Amygdalins unabhängig, wie es die Theorie verlangt (Auld, l. c. S. 1270).

Endlich sind noch polarimetrische Versuche von Henri und Lalou (Soc. Biol. **55**, 868; 1903) über die gleichzeitige Spaltung des Amygdalins und Salicins zu erwähnen.

t	2 %	2,5 %	2 % Salicin	4 %	1,25 %
Minuten	Salicin	Amygdalin	+ 2,5 % Amygdalin	Salicin	Amygdalin
46	0,67	0,97	1,05	1,08	0,90
130	1,58	2,38	3,63	2,25	1,57
268	2,32	3,15	4,22	3,45	1,56
∞	3,15	3,17	6,32	6,30	1,59

Wie ersichtlich erfolgt die Spaltung der Mischung viel langsamer als die der beiden Bestandteile zusammen. Auch dieses deutet auf die Verbindung von Enzym und Substrat hin.

Optimum wird zu etwa 45° angegeben. Ziemlich resistent gegen Chloroform und Thymol.

Proteolytische Enzyme.

Die ersten genauen Versuche über den zeitlichen Verlauf der Eiweissspaltung durch Pepsin verdankt man E. Schütz (H. **9**, 577; 1885). Dieselben waren mit Lösungen von globulinfreiem Eieralbumin angestellt (etwa 1 g Albumin in 10 ccm Lösung); sie wurden mit etwa 5 ccm 5%iger Salzsäure und mit der Pepsinlösung versetzt, deren Gehalt bestimmt werden sollte; diese Mischung wurde auf 100 ccm verdünnt und während 16^h bei $37{,}5^0$ gehalten. Man entfernte dann das Eiweiss aus der Lösung und bestimmte aus der optischen Drehung letzterer die Menge der gebildeten Peptone. In dieser Weise fand Schütz die Verdauungsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Pepsinkonzentration. Von den drei Versuchsreihen sei hier die erste angeführt:

Pepsinmenge	Peptondrehung in Minuten	
	Beobachtet (Mittel)	Berechnet
1	7,3	7,4
2	9,75	10,4
3	12,8	12,7
4	14,8	14,7
5	16,5	16,4
6	18,45	18,9

Sodann wären Versuche von Borissow mit Trypsin und von Samojloff mit Pepsin zu erwähnen, denen diese Forscher ebenfalls die Beziehung $x = \varkappa\sqrt{Et}$ entnommen haben (Diss. Petersburg 1901, Arch. des Sciences Biol. **2**, 699; 1893, siehe Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen). Es war mit diesen Versuchen nicht beabsichtigt, einen Einblick in die chemische Dynamik der Enzymwirkung zu gewinnen, und infolge der gewählten Versuchsmethodik lassen sich denselben auch keine diesbezüglichen Schlüsse entnehmen. Das gleiche gilt von den Versuchen von Walther (Arch. d. Sciences Biol. **7**, 15; 1899).

Ein recht umfangreiches Zahlenmaterial über die Pepsinverdauung durch Eiweiss hat 1895 J. Sjöqvist beigebracht (Skand. Arch. f. Physiol. **5**, 317; 1895). Er verfolgte den Verlauf der peptischen Verdauung durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit. Je 100 ccm Lösungen, 0,05 norm. in bezug auf Salzsäure, enthielten 2,23 g Albumin (durch Dialyse nahezu von Salzen befreit) und ausserdem 2,5 resp. 5, 10 oder 20 ccm Pepsinlösung. Die Leitfähigkeit dieser Lösungen sank während des Versuches von dem Anfangswert $\mu = 188{,}4$ (alte Einheiten) auf einen Endwert von etwa 83,4. Die Abnahme Δ der Leitfähigkeit vom Anfangswert wurde der umgesetzten Menge x proportional angenommen. Die folgenden Tabellen enthalten die

mit 2,5, mit 5, mit 10 und mit 20 ccm Pepsin bei 37° ermittelten Werte Δ_{obs}. Daneben stehen die mit denselben proportionalen Werte von x, ferner die nach der Arrheniusschen Formel (18) bezw. (20) berechneten Konstanten $\varkappa_A$ und endlich die nach der Schützschen Regel $x = \varkappa_S \sqrt{t}$ berechneten Konstanten.

Pepsinkonzentration 2,5.

Stunden	Leitfähigk. μ	Änderung d. Leitf. Δ	x	$\varkappa_A$	$\varkappa_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
0	188,4				
0,5	—	—			
1	—	—			
2	177,3	11,1	10,5	2,97	7,45
4	171,1	17,3	16,41	3,78	8,21
6	167,4	21,0	19,93	3,81	8,13
8	164,5	(23,9)	22,68	3,77	8,02
9	163,1	25,3	24,00	3,82	7,90
12	159,9	28,5	27,04	3,70	7,70
16	156,4	(32,0)	30,36	3,62	7,59
20	152,9	35,5	33,68	3,70	7,53
32	146,2	42,2	40,04	3,40	7,08
48	139,8	(48,6)	45,06	3,20	6,50
64	135,0	(53,4)	50,78	3,13	6,34
96	127,9	60,5	57,41	2,80	5,87
∞				3,49	

Pepsinkonzentration 5.

Stunden	Leitfähigk. μ	Änderung d. Leitf. Δ	x	$\varkappa_A$	$\varkappa_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
0	188,4	—	—		—
0,5	—	—	—		—
1	178,2	10,2	9,68	4,93	9,8
2	172,8	15,6	14,80	6,09	10,5
4	164,7	23,7	22,49	7,49	11,2
6	159,5	28,9	27,42	7,70	11,2
8	155,5	(32,9)	31,22	7,62	11,0
9	153,5	(34,9)	33,11	7,88	11,0
12	149,4	39,0	36,58	7,47	10,6
16	145,2	(43,2)	40,15	8,25	10,0
20	141,0	47,4	44,98	7,39	10,0
32	133,1	(55,3)	52,47	6,85	9,3
48	126,2	(62,2)	59,02	6,30	8,5
64	121,4	(67,0)	63,58	5,85	7,9
96	114,4	74,0	70,21	5,21	7,3
∞				6,84	

Pepsinkonzentration 10.

Stunden	Leitfähigk. μ	Änderung d. Leitf. Δ	x	$\varkappa_A$	$\varkappa_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
0	188,4	—	—		
0,5	179,2	9,2	8,73	8,04	12,35
1	174,2	14,2	13,47	10,34	13,47
2	165,9	22,5	21,35	13,40	15,10
4	154,8	33,6	31,88	16,30	15,94
6	148,0	40,4	38,34	16,65	16,01
8	143,2	(45,2)	42,88	16,42	15,31
9	140,8	47,6	45,14	16,51	15,05
12	136,1	52,3	49,62	14,09	14,32
16	130,9	(57,5)	54,56	15,23	13,64
20	125,7	62,7	59,50	15,44	13,30
32	119,4	(69,0)	65,46	12,90	11,60
48	113,1	75,3	71,45	11,25	10,31
64	109,1	(79,3)	75,25	10,08	9,41
96	101,8	86,6	82,17	9,60	8,39
∞				13,3	

Pepsinkonzentration 20.

Stunden	Leitfähigk. μ	Änderung d. Leitf. Δ	x	$\varkappa_A$	$\varkappa_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
0	188,4	—			
0,5	176,0	12,4	11,77	15,0	16,64
1	167,8	20,6	19,55	22,2	19,55
2	157,9	30,3	28,75	25,9	20,33
4	144,5	43,9	41,66	30,6	20,83
6	137,2	51,2	48,58	29,7	19,83
8	133,0	(55,4)	52,57	25,1	18,54
9	130,1	58,3	55,32	28,0	18,44
12	125,8	62,6	59,40	25,6	17,15
16	121,6	(66,8)	63,34	25,1	15,81
20	117,3	71,7	68,03	22,5	15,21
32	109,8	78,6	74,58	19,5	13,18
48	102,3	86,1	81,70	18,3	11,79
64	97,4	(91,0)	86,34	14,4	10,49
96	91,2	97,2	92,24	18,0	9,41
∞				22,7	

Auch die Beobachtungen von Sjöqvist schliessen sich also in der ersten Hälfte der Reaktion der Beziehung $x = \varkappa_S \sqrt{t}$ einigermassen an.

Vergleicht man die für die Enzymkonzentrationen E der 4 Versuchsreihen von Sjöqvist gefundenen Konstanten, so findet man, dass sich dieselben angenähert wie $\sqrt{0{,}2} : \sqrt{0{,}1} : \sqrt{0{,}05} : \sqrt{0{,}025}$ verhalten.

$\varkappa_S$	7,6	10,4	14,1	18,2
$\sqrt{E}$	0,500	0,707	1,00	1,42
Quotient	15,2	14,7	14,4	12,8

Es trifft also für kleine und gleiche Werte von t die Schützsche Regel zu, dass die Menge des umgewandelten Stoffes der Quadratwurzel aus

der Enzymkonzentration umgekehrt proportional ist. In viel grösserem Umfange gilt die Proportionalität zwischen der gespaltenen Eiweissmenge und der Quadratwurzel aus Et (Enzymkonzentration × Zeit). Dies zeigt sich in folgender Tabelle, in welcher Arrhenius (Immunochemie S. 43) die Abnahmen der Leitfähigkeiten nach Sjöqvist zusammengestellt hat.

Et =	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	4,8	6,4	9,6
E = 0,025	11,1	17,3	23,9	32,0	42,2	53,4				
0,05	10,2	15,6	23,7	32,9	43,2	55,3	67,0	74,0		
0,01	9,2	14,2	22,5	33,6	45,2	57,5	69,0	75,3	79,3	86,6
0,02	—	12,4	20,6	30,3	43,7	55,4	66,8	73,6	78,6	86,1
Mittel	10,2	14,9	22,7	32,2	43,8	55,4	67,6	74,3	79,0	86,4
Ber.	11	15,6	22	31,1	44					

Weitere Versuche über die Pepsinverdauung verdankt man Julius Schütz (H. **30**, 1; 1900). Er koagulierte das unverdaute Eiweiss seiner nach 15 Stunden entnommenen Versuchsproben und bestimmte im Filtrat den Stickstoff nach Kjeldahl. Bei einer Versuchstemperatur von 38° fand er folgende Mengen von gespaltenem Eiweiss x_{beob}, neben welchen die aus der Schützschen Regel berechneten Werte tabelliert sind.

Pepsinmengen	10^4 x beob.	10^4 x ber.
1	212	213
4	471	426
9	652	639
16	799	852
25	935	1065
36	1031	1278

Im gleichen Jahre haben E. Schütz und Huppert (Pflüg. Arch. **80**, 470; 1900) weitere Daten über die Pepsinverdauung beigebracht. Die entstehenden Abbauprodukte des Eiweisses — als sekundäre Albumosen bezeichnet — wurden wieder polarimetrisch bestimmt. „Die Mengen der gebildeten sekundären Albumosen verhalten sich wie die Quadratwurzeln aus den Zeiten". Ferner stehen die Mengen des verdauten Albumins, die Summe der Zwischenprodukte und die Mengen der sekundären Albumosen in demselben Verhältnis wie die zu den Versuchen verwendeten Albuminmengen, nämlich 1 : 2 : 3 : 4.

Auch den Einfluss der Salzsäure haben E. Schütz und Huppert berücksichtigt. Unter gewissen Bedingungen entstehen die sekundären Albumosen einfach proportional der Albuminmenge und proportional der Wurzel aus der Versuchszeit, der Pepsinkonzentration und der Säurekonzentration. Die Bedingungen, unter welchen diese Regel zutrifft, sind ein mässig schneller Verlauf der Reaktion und für die Säure eine 0,2% nicht übersteigende Konzentration.

Bezeichnen wir die sekundären Albumosen mit S und die Albuminmengen mit A, die Versuchszeit mit t, die Salzsäurekonzentration mit s und die Pepsinmenge mit P, so wird die Geschwindigkeit, mit welcher die sekundären Albumosen entstehen, ausgedrückt durch

$$S = \varkappa'' A \sqrt{t \cdot P \cdot s}$$

Nicht unerwähnt soll bleiben, dass gegen die Methodik dieser Versuche von Sjöqvist (l. c.) Einwände erhoben worden sind.

Vor einiger Zeit hat Gross (Berl. Klin. Wochenschr. **45**, 643; 1908) geglaubt nachweisen zu können, dass die Schützsche Regel bei der peptischen Verdauung nicht gilt, sondern dass die verdaute Menge der Fermentmenge direkt, der Verdauungszeit umgekehrt proportional ist. Die Arbeitsweise von Gross war folgende: Zu gleichen Mengen einer sauren Kaseinlösung werden steigende Mengen Pepsin zugesetzt, und man beobachtet, nach welcher Zeit die gesamte Kaseinmenge verdaut war, d. h. wann nach Zusatz von gesättigter Natriumacetatlösung keine Trübung mehr eintrat.

Man erkennt so die geringsten Mengen von Magensaft, durch die in 15 Minuten alles Kasein verdaut wird. Die Beobachtungen geschahen in Zwischenräumen von 10—20 Sekunden, die Versuchstemperatur war 40°.

Es seien folgende Versuchsreihen angeführt:

Kaseinmenge: 50 ccm		Kaseinmenge: 50 ccm	
Magensaft ccm	Verdaut nach Minuten	Pepsin Grübler 1 p. M. ccm	Verdaut nach Minuten
1,0	52,7	1,0	64,0
2,0	25,0	2,0	31,7
4,0	12,2	4,0	16,7
8,0	6.25		

Zur Prüfung des Grossschen Ergebnisses hat Kurt Meyer (Berl. Klin. Wochenschr. **45**, 1485) einige Versuche mit der Fuldschen Edestinmethode angestellt [1]). Die Pepsinmengen wurden im Quadrat gesteigert, während die Eiweissmenge in jedem Röhrchen um das Doppelte anstieg. K. Meyer stellt seine Pepsinversuche in zwei Tabellen zusammen, von denen wir die eine wiedergeben:

1% Edestinlösung in 0,03 HCl	1% Pepsinlösung (Grübler) in 0,03 HCl			
	0,0025 ccm	0,01 ccm	0,04 ccm	0,16 ccm
0,1 ccm	+	—	—	—
0,2 „		+	—	—
0,4 „			+	—
0,8 „				+
1,6 „				
3,2 „				

[1]) Die Methode wurde in der Weise modifiziert, dass auch die Bestimmung der Verdauungsmengen in einen Reihenversuch aufgelöst wurde, indem Reihen mit steigenden Mengen Edestin hergestellt, und zu solchen unter sich gleichen Reihen steigende Pepsinmengen gefügt wurden.

Die eben beginnende Trübung ist mit + bezeichnet.

Man erhält keine exakte Vorstellung, wie gross hierbei die Versuchsfehler sind; jedenfalls zieht K. Meyer aus seinen Versuchen selbst den Schluss, dass die Schützsche Regel für die peptische Verdauung gilt.

0,05 ccm Magensaft

Kaseinmenge ccm	Verdaut nach Minuten
5	6,3
6	7,5
7	8,7
8	10,0
10	13,3
12	14,3
14	17,0
16	21,2

Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, dass Spriggs (Journ. of Physiol. **35**, 465; 1902) den Verlauf der Pepsinwirkung durch Messungen der inneren Reibung im Ostwaldschen Viskosimeter verfolgt hat. Gegen die Versuche kann man indessen einwenden, dass die Abhängigkeit der Viskosität von dem Grade der Eiweissspaltung nicht ausreichend bekannt ist, weshalb aus den in Rede stehenden Messungen sichere Schlüsse kaum gezogen werden können.

Über die Wirkung von Pflanzenproteasen hat Weis (Medd. fra Carlsberg-Lab. **5**, 127; 1903) eingehende Versuche angestellt. Er fand, dass die peptische Wirkung relativ schnell verläuft, während die tryptische Zerlegung der Albumosen langsam weitergeht; die beiden Spaltungen können bis zu einem gewissen Grad getrennt werden. Von den Resultaten, deren eingehendere Bearbeitung vielfach auf Schwierigkeiten stösst, ist hervorzuheben, dass auch bei der Proteolyse des Pflanzenproteins, in einem gewissen Konzentrationsgebiet wenigstens, die Schützsche Regel zu gelten scheint. Der Exponent der Enzymkonzentration wächst nach den Versuchen S. 176 a. a. O. mit steigender Verdünnung des Enzyms von 0,5 (Schützsche Regel) bis 1.

Bei den einzelnen Versuchsreihen verhalten sich die umgesetzten Mengen (x) wie die Quadratwurzeln aus den Versuchszeiten. Wir entnehmen der Tabelle S. 183 die folgenden Zahlen und setzen daneben die Werte $x : \sqrt{t}$.

Stunden t	Umges. mg N x	$x : \sqrt{t}$	Stunden t	Umges. mg N x	$x : \sqrt{t}$
1	5,34	5,34	1	5,80	5,80
2	8,42	5,96	2	8,54	6,04
3	9,82	5,67	3	(12,00)	5,50
4	11,92	5,96	4	11,34	5,67
5	12,98	5,81	5	12,94	5,79
6	13,70	5,59	6	13,32	5,44
9	17,22	5,74	9	14,20	4,73

Ferner habe ich die Versuchsreihen berechnet, in welchen Weis die Konzentration a des Substrates (Proteins) variiert hat. In der dritten Spalte

findet man die Konstanten k für monomolekulare Reaktionen, in der vierten das Produkt ka, in der fünften endlich die Konstante $\varkappa_S$ der Formel $x\sqrt{a} = \varkappa_S$.

Nach 5 Stunden [1]).

Proteinkonzentration a	Umgesetzter N in Prozenten des Gesamt-N x	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	k . a . 10^6	$\varkappa_S$
1 %	36,2	0,00065	65	36,2
2 „	25,9	0,00043	86	36,6
3 „	20,3	0,00033	100	35,2
4 „	16,0	0,00025	100	32,0
5 „	13,2	0,00020	102	29,5

Nach 2 Stunden [1]).

Proteinkonzentration a	Umgesetzter N in Prozenten des Gesamt-N x	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	k . a . 10^6	$\varkappa_S$
1 %	22,0	0,00090	90	22,0
2 „	17,0	0,00067	134	24,0
3 „	13,1	0,00051	153	22,7
4 „	9,1	0,00035	140	18,2
5 „	7,9	0,00030	150	17,7

Wie man sieht, sinkt die umgesetzte Proteinmenge mit steigendem a. Arrhenius (Immunochemie S. 55) deutet dies folgendermaassen: Wenn beispielsweise 10% der Proteinmenge verdaut sind, so ist bei doppelter Anfangskonzentration a die absolute Menge der Reaktionsprodukte doppelt so gross. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber der absoluten Menge der Reaktionsprodukte, also auch der Anfangskonzentration umgekehrt proportional. Nach dem S. 96 Gesagten wird also die umgesetzte Menge, in Prozenten der totalen Proteinmenge ausgedrückt, nahezu der Quadratwurzel aus a umgekehrt proportional, wie die fünfte Spalte der beiden obigen Tabellen zeigt.

Die Arbeit von Weis über pflanzliche Proteinasen führt uns in das Gebiet der Trypsine hinüber, also in das Gebiet derjenigen proteolytischen Enzyme, welche in alkalischer Lösung spalten.

H. M. Vernon glaubt aus seinen Versuchen (Journ. of Physiol. **26**, 421; 1901), welche im wesentlichen mit der Mettschen Methode ausgeführt sind, den Schluss ziehen zu können, dass bei der Verdauung von Fibrin und Trypsin die Schützsche Regel zutrifft, sofern man die Verdauungszeiten wegen der Zerstörung des Trypsins in der Sodalösung korrigiert.

[1]) Die Zahlen der beiden Tabellen sind in 2 getrennten Versuchsreihen erhalten worden, und deshalb unter sich nicht vergleichbar.

Angew. Enzymextrakt E in ccm	Verdauungszeit, t Min.	Korrig. Verdauungszeit, t Min.	t × E
2	11,8	11,14	16,2
1	17,7	16,25	16,3
0,5	26,8	23,62	16,7
0,25	36,1	30,57	15,3
0,125	80,4	57,32	20,3
0,0625	176,0	93,57	23,4

Wie qualitativ schon lange bekannt ist, besitzt die Konzentration der bei der Pepsinverdauung anwesenden Säure einen erheblichen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Quantitativ kommt dies auch in der S. 129 erwähnten Formel von Schütz zum Ausdruck, nach welcher — bei gewissen gegebenen Bedingungen der Enzym- und Substratkonzentration — die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Wurzel aus der Konzentration der Salzsäure proportional ist.

Sehr eingehend ist ganz neuerdings die Optimalkonzentration der Wasserstoffionen von Sörensen festgestellt worden (Medd. fra Carlsberg-Lab. 8, 1; 1909). In dieser gründlichen Arbeit ist die Konzentration der H-Ionen elektrometrisch bestimmt worden; der Fortschritt der Reaktion wird durch die Menge des nach verschiedenen Zeiten mit Stannochlorid resp. mit Gerbsäure fällbaren Eiweisses ermittelt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Unter p_H sind in der ersten Spalte die „Wasserstoffionenexponenten" angegeben. Sörensen versteht darunter den Briggschen Logarithmus des reciproken Wertes des auf Wasserstoffionen bezogenen Normalitätsfaktors der Lösung. Daneben ist die Konzentration der H-Ionen in der sonst üblichen Form angegeben.

Wasserstoffionen-Konz.		Zunahme (in mg) des mit Stannochlorid nicht fällbaren Stickstoffes nach t Stunden langer Verdauung								Zunahme (in mg) des mit Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffes nach t Stunden langer Verdauung.					
pH	Konz.	t=½	1	2	4	8	13	20	49	t=1½	3	6	12	24	48
0,76	$1{,}7 \cdot 10^{-1}$	6,04	8,50	13,24	19,34	22,80	25,60	—	—	3,82	6,02	9,25	12,38	15,16	—
0,99	$1{,}0 \cdot 10^{-1}$	6,62	9,32	14,34	21,02	24,10	25,72	28,42	30,28	4,22	6,60	9,58	13,22	15,46	18,26
1,22	$6 \cdot 10^{-2}$	9,04	12,26	17,74	—	27,50	27,74	28,80	31,32	5,08	7,46	10,46	13,92	16,22	18,94
1,63	$2 \cdot 10^{-2}$	11,00	15,24	18,70	24,76	27,86	28,45	28,94	30,92	5,06	7,32	10,22	13,38	15,86	18,66
2,26	$5 \cdot 10^{-3}$	10,82	15,00	17,50	22,06	25,14	26,42	27,08	28,08	4,22	6,20	8,86	11,64	14,62	17,32
4,09	$8 \cdot 10^{-5}$	7,84	10,80	12,42	13,30	—	13,58	—	16,12	0,94	1,48	2,52	3,86	5,62	8,04

Das Aciditätsoptimum fällt, wie man sieht, um so grösser aus, nach je längerer Zeit man die Pepsinwirkung vergleicht.

Der Einfluss der Salzsäure dürfte sich, wie schon erwähnt, in der Weise erklären, dass das Eiweisschlorhydrat leichter angegriffen wird als das freie Eiweiss. Auch das Enzym selbst ist vielleicht in Form des Salzes, also als Pepsinchlorid wirksamer, eine Möglichkeit, welche neuerdings auch J. Loeb (Biochem. Z. **19**, 534; 1909) betont hat; sichere Anhaltspunkte darüber liegen noch nicht vor. Etwas anderes als ein Pepsinsalz der Salzsäure wird man, wie Verf. schon früher (Ergebn. d. Physiol. **6**) erwähnt hat, mit der „Pepsinchlorwasserstoffsäure", deren Existenz mehrfach angenommen wurde, nicht ausdrücken wollen.

Die älteren Versuche von Borissow über die tryptische Verdauung sind schon früher erwähnt worden.

Gleichfalls mit der Mettschen Methode hat L. Pollak (Hofm. Beitr. **6**, 95; 1904) die Wirkungsweise seines isolierten, auf Gelatine wirkenden tryptischen Enzyms Glutinase untersucht, und gelangte zum Resultat, dass die Wirksamkeit des Leimfermentes zwar nicht genau der Regel von Schütz entspricht, sich derselben aber doch weit mehr annähert, als dies beim Enzymgemenge eines gewöhnlichen Pankreasinfuses oder des Grüblerschen Trypsins der Fall ist.

V. Henri und Larguier des Bancels haben die Einwirkung von Trypsin auf Gelatine untersucht (C. r. **136**, 1581; 1902). Indem sie, wie früher Sjöqvist, die Änderung der Leitfähigkeit dem Fortschreiten der Reaktion proportional setzen, finden sie die Formel $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ bestätigt. Da indessen der Endwert des Vorgangs nicht beobachtet (oder wenigstens nicht angegeben) ist, und die Beobachtungen sich nur über die sehr kurze Zeit von etwa einer Stunde erstrecken, die eigentliche Eiweissspaltung also sehr wenig weit gegangen sein kann, so sagen diese Versuche wenig über den Verlauf der Trypsinverdauung aus. Wie Arrhenius berechnet hat, ändert sich die Leitfähigkeit ungefähr proportional mit der Quadratwurzel aus den Verdauungszeiten.

t Minuten	10	20	30	40	50
Leitfähigkeit (Mittel)	27,3	44,0	53,0	58,7	65,7
$7{,}37\ \sqrt{t}$	29,3	41,5	50,0	58,7	68,8

Umfassender sind die Versuche von Bayliss (Arch. des Sciences Biolog. **11**, Suppl. Petersburg 1904), welche gleichfalls mit der Methode der Leitfähigkeit angestellt worden sind. Als Substrat diente teils Kaseinat in schwach ammoniakalischer Lösung, teils Gelatine. Die Versuchsergebnisse sind meist graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass die für monomolekulare Reaktionen gültige Konstante mit der Zeit stark abnimmt, was der verzögernden Wirkung der Reaktionsprodukte zuzuschreiben ist. Demgemäss schliessen sich auch die von Bayliss beobachteten Zahlen gut an die Formel

$a \ln \frac{a}{a-x} - x = zEt$ an. Die Geschwindigkeit der Verdauung ist bis zu etwa 4%igen Kaseinlösungen der Konzentration des Substrates proportional; in 4—8%igen Lösungen ist die Geschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration, bei mehr als 8% tritt umgekehrte Proportionalität ein. Was die Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Enzymkonzentration betrifft, so besteht im ersten Viertel der Reaktion angenäherte Proportionalität; schon im zweiten Viertel der Reaktion erweist sich die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich kleiner als der Trypsinkonzentration entspricht (l. c. p. 26).

Unter Anwendung der Volhardschen Methode zur Pepsin- und Trypsinbestimmung, auf die wir im Anhang noch zurückkommen werden, kommt W. Löhlein (Hofm. Beitr. **7**) zum Resultat, dass die Trypsinverdauung der Schützschen Regel nicht folgt. Auch die Versuche von O. Faubel (Hofm. Beitr. **10**, 35; 1905) schliessen sich der Schützschen Regel nicht an.

An welche Bedingungen die Gültigkeit der einfachen Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration gebunden ist, lässt sich den vorhandenen Messungen noch nicht mit der wünschenswerten Sicherheit entnehmen. Jedenfalls sind weit öfter als bei den Versuchen mit Pepsin die Versuchsverhältnisse solche gewesen, dass die Beziehungen:

$$\text{Verdaute Eiweissmenge} = \text{konst.} \sqrt{E}$$

$$\text{und Verdaute Eiweissmenge} = \text{konst}' \sqrt{t}$$

nur in sehr beschränktem Umfang gültig befunden wurden.

Recht allgemein scheint dagegen wie auch beim Pepsin (vergl. S. 129) die Regel zu gelten, dass eine gleiche Menge a von Eiweiss verdaut wird, wenn man die Enzymmenge umgekehrt mit der Zeit variiert, also

$$x = \text{konst. } f\,(E \cdot t) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (22)$$

Die Regel gilt offenbar zunächst für solche Fälle, wo die Proportionalität zwischen x und E.t eine direkte ist; es trifft dies bei ungestörten monomolekularen katalytischen Reaktionen zu, so lange die Menge des Reaktionsproduktes x noch klein ist gegen die vorhandene Substratmenge a; ferner gilt diese Regel bei Trypsin nach Messungen von Bayliss, Hedin u. a. sowohl für kleine Enzymmengen als auch sonst, wenn die Reaktionsbedingungen so gewählt sind, dass

$$x = \text{konst.} \sqrt{E} \,.\, t.$$

Vergegenwärtigt man sich die Herleitung der Formel (18), so sieht man, dass diese Regel auch in dieser bereits mehrfach angewandten Formel enthalten ist.

Der Inhalt der Formel (22) ist offenbar der, dass es für den Fortschritt der Verdauung nur auf die Menge des schon gespaltenen Eiweisses ankommt, gleichgültig ob dieses in kürzerer Zeit durch mehr Enzym oder in längerer Zeit durch weniger Enzym erzeugt worden ist.

Sehr gute Bestätigungen dieser Beziehung verdankt man Hedin (Journ. of Physiol. **32**, 468; 1905, — ebenda **34**, 370; 1906, — H. **57**, 471; 1908). Aus letzterer Arbeit geben wir eine Tabelle wieder:

Es wurden die Stickstoffmengen bestimmt, welche durch Gerbsäure nicht fällbar waren, dieselben sind ein Maass der verdauten Kaseinmengen. Die in den verschiedenen Spalten unter den Werten E.t eingetragenen Ziffern bedeuten die Anzahl ccm 0,1 norm. Säure, welche zur Neutralisierung des aus gleichen Volumina des Gerbsäurefiltrats nach Kjeldahl erhaltenen Ammoniaks erforderlich waren:

E.t	1,0	2,0	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0
1	5,8	10,35	12,95	20,15	24,50	26,95	31,0	34,05
2	5,85	10,75	13,25	20,40	24,65	27,8	31,7	—
3	5,70	10,85	13,35	20,30	24,35	27,0	31,05	33,75
4	6,10	10,75	13,15	19,90	23,80	26,95	30,75	33,55

Wenn es gilt, die Kinetik der Verdauungsenzyme festzustellen, so treten zu den mit allen enzymatischen Untersuchungen verknüpften Schwierigkeiten durch die komplizierte Zusammensetzung der Eiweisskörper noch neue Komplikationen hinzu. Was wir mit irgend einer der angewandten physikalisch-chemischen Methoden, seien sie optisch, seien sie elektrisch, beobachten, ist der Effekt einer grossen Zahl gleichzeitig nebeneinander verlaufenden Spaltungen, und wir müssen uns, wie Verf. mehrfach betont hat, eigentlich wundern, dass so oft die direkten, einfachen Beziehungen gefunden worden sind. Erheblich durchsichtiger werden deshalb die Spaltungsvorgänge, wenn wir die durch die Arbeiten Fischers zugänglich gewordenen Dipeptide als Substrat verwenden. Die ersten diesbezüglichen Versuche hat Verf. mit Glycylglycin angestellt, welches zwar nicht durch das Trypsin des Pankreas, wohl aber durch das proteolytische Enzym der Darmwand, das sog. Erepsin gespalten wird.

Der Reaktionsverlauf wurde durch die Änderung der Leitfähigkeit verfolgt, welche durch die Spaltung in alkalischer Glycylglycinlösung eintritt. Der Endwert der Leitfähigkeit, welcher erreicht wird, wenn das Glycylglycin vollständig gespalten ist, wurde ausgehend von entsprechend konzentrierten Glykokollösungen bestimmt; in der hierdurch ermöglichten sicheren Kenntnis des Endwertes scheint mir einer der Hauptvorzüge der Dipeptide als Substrate der Trypsin- und Erepsinspaltung zu liegen. Es wurde ferner noch eingehend festgestellt, dass die Abnahme der Leitfähigkeit proportional der Abnahme der Dipeptidkonzentration ist[1]).

Zunächst ergab sich, dass die Spaltungsgeschwindigkeit des Glycylglycins in hohem Grade von der Alkalinität[2]) der erepsinhaltigen Lösung abhängig ist.

[1]) Es ist zu beachten, dass der Nachweis einer solchen Proportionalität, welche die Grundlage für weitere Berechnungen bildet, bei den früheren Arbeiten, in welchen mit der Leitfähigkeit die tryptische oder peptische Verdauung von Eiweiss verfolgt wurde, nicht erbracht worden ist.

[2]) Die Alkalinität ist durch die Normalität des gesamten Na ausgedrückt. Die wirkliche Alkalinität, also die Konzentration der freien Base ist sehr viel geringer, da der grösste Teil zur Neutralisation des Glycylglycins verbraucht wird.

1/10 n Glycylglycin. 5 g Erepsinpulver in 100 ccm.

Alkali-Konzentration	0	0,04	0,05	0,075	0,10
Reaktionskonstante × 1000	< 0,05	7,0	6,2	2,6	0,2

Verschiedene Präparate erweisen sich übrigens verschieden empfindlich gegen Alkali.

Sodann wurde festgestellt, dass die Spaltung des Glycylglycins eine Reaktion erster Ordnung ist, und dass die entsprechenden Geschwindigkeitskoeffizienten k unter günstigen Umständen bis zum Ablauf der halben Reaktion wirklich konstant bleiben [1]).

0,10 n Glycylglycin. 5 g Erepsinpulver in 100 ccm Lösung.

a. 0,04 n Na.			b. 0,05 n Na.		
Minuten	1000 (a−x)	1000 k	Minuten	1000 (a—x)	1000 k
0	920	—	0	935	—
7	819	7,20	10	806	6,46
15	721	7,08	17	739	6,00
22	649	6,88	25	654	6,18
30	579	6,70	30	622	5,90

In den meisten Fällen tritt schon nach etwa 1/2 Stunde eine starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ein. Dies beruht in erster Linie auf der Zerstörung des Erepsins; dieselbe erfolgt um so schneller, je mehr freies Alkali sich in der Lösung befindet.

Von der Konzentration des Dipeptids ist die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb gewisser Grenzen fast unabhängig. Diese Unabhängigkeit gilt indessen nur für gewisse Konzentrationsverhältnisse Enzym : Substrat. Bei kleiner Enzymmenge stieg die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Konzentration des Glycylglycins.

0,1 n Glycylglycin; 0,04 n Na
1000 k = 0,35

0,2 n Glycylglycin; 0,05 n Na
1000 k = 0,55

Da, wie erwähnt, hier auch noch die Konzentration des freien Alkalis die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Maasse beeinflusst, so ist der Einfluss der Substratkonzentration recht schwierig aufzuklären. Verf. hat aus seinen Versuchen den Schluss gezogen, dass nur das Alkalisalz des Peptids der Spaltung unterliegt. (Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **2**, Nr. 39: 1907.)

Was schliesslich den Einfluss der Enzymkonzentration betrifft, so kann gesagt werden, dass in den meisten der untersuchten Konzentrationsverhältnisse die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional der Enzymkonzentration

[1]) Da das Verhalten des Erepsins, wie das anderer Fermente von der absoluten Wirksamkeit der Lösung abhängt, so dürfte es sich empfehlen, um verschiedene Resultate vergleichbar zu machen, eine Normalwirkung festzulegen. Als Normalpräparat könnte etwa ein solches bezeichnet werden, welches in 5%iger Lösung Glycylglycin oder ein optisch aktives Dipeptid in 1 Stunde zur Hälfte spaltet.

waren. Die Schütz-Borissowsche Regel erwies sich in keinem Falle gültig. Ich führe folgende Zahlenbeispiele an:

Erepsinkonzentration:	5	4	3	2
1000 k:	6,5	5,1	4,3	2,8

Bei kleinen Enzymkonzentrationen, besonders bei Anwendung schwacher Pankreatinpräparate, steigt k viel schneller als die Enzymkonzentration.

Bei relativ grossen Enzymkonzentrationen treten allerdings Abweichungen von der Proportionalität im Sinne der Schützschen Regel ein; indessen werden bei diesen innerhalb weniger Minuten verlaufenden Reaktionen die Versuchsfehler zu gross, als dass Schlüsse aus diesem Zahlenmaterial gezogen werden könnten.

Verwendet man als Substrat optisch aktive Polypeptide, so lässt sich die enzymatische Spaltung oft polarimetrisch verfolgen. Solche Messungen verdankt man Abderhalden und seinen Mitarbeitern.

Auf das Zeitgesetz beziehen sich die folgenden, mit d-Alanyl-d-Alanin angestellten Versuchsreihen (Abderhalden und Koelker, H. **51**, 294; Abderhalden und Michaelis, H. **52**, 326; 1907).

0,45 g Dipeptid + 6 ccm Presssaft

Minuten	Drehung	x	$\frac{10^3 x}{t}$	$k \cdot 10^4$
0	— 1,21°	0		
3	— 0,96°	0,39	130	453
7	— 0,74°	0,59	84	390
11	— 0,51°	0,84	71	382
18	— 0,20°	1,15	64	380
20	— 0,16°	1,19	59	373
27	+ 0,01	1,36	50	451
34	+ 0,05	1,40	41	430
40	+ 0,07	1,42	35	
55	+ 0,10	1,45		
65	+ 0,10	1,45		

0,45 g Dipeptid + 4 ccm Presssaft + 2 ccm physiol. Kochsalzlösung

Minuten	Drehung	x	$\frac{10^3 x}{t}$	$k \cdot 10^4$
0	— 1,31°	0		
3	— 1,17°	0,18	60	192
7	— 0,98°	0,37	53	183
10	— 0,81°	0,54	54	202
16	— 0,56°	0,79	49	214
25	— 0,21°	1,14	46	268
30	— 0,09°	1,26	42	294
35	+ 0,02°	1,37		359
43	+ 0,07°	1,42		
54	+ 0,08°	1,43		

0,45 g Dipeptid + 3 ccm Presssaft + 3 ccm physiol. Kochsalzlösung.

Minuten	Drehung	x	$\frac{10^3 x}{t}$	$k \cdot 10^4$
0	— 1,31°	0		
5	— 1,16°	0,19	380	125
6,5	— 1,09°	0,26	400	132
7,5	— 1,05°	0,30	400	134
16	— 0,76°	0,59	369	142
22	— 0,51°	0,81	368	161
28	— 0,32°	1,03	368	192
30	— 0,25°	1,10	314	209
38	— 0,09°	1,28	332	232
45	+ 0,01°	1,36		265
60	+ 0,07°	1,42		

0,6 g d-Alanyl-d-Alanin in 7,6 ccm Presssaft + 0,4 ccm physiol. Kochsalzlösung

Min.	Drehung	x	$\frac{x}{t}$	k . 10^4
0	— 1,30	0		
5	— 1,08	22	44	148
12	— 0,85	45	38	140
19	— 0,59	71	38	162
26	— 0,23	107	40	241
30	— 0,09	121	40	289
			40	

0,6 g d-Alanyl-d-Alanin + 5,7 ccm Presssaft + 2,3 ccm physiol. Kochsalzlösung

Min.	Drehung	x	$\frac{x}{t}$	k . 10^4
0	— 1,23	0		
7	— 1,09	21	30	60
13	— 0,91	39	30	92
26	— 0,46	84	32	144
37	— 0,11	119	32	216
50	—	140	28	—
			30	

Die theoretische Formel $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$ führt, wie man sieht, zu Reaktionskoeffizienten, welche durchweg steigen, und zwar um so mehr, je kleiner die Enzymmenge bei gleichbleibender Substratmenge ist.

Bei relativ kleiner Enzymmenge wird andererseits der Ausdruck $\frac{x}{t}$ auffallenderweise konstant, was darauf hinzudeuten scheint, dass der Umsatz unabhängig von der Menge des noch zu spaltenden Substrates verläuft. Wahrscheinlicher ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeit dx : dt, wie immer, proportional mit der vorhandenen Menge Substrat ist, dass aber dieser Umsatz mit fortschreitender Reaktion eine sekundäre Beschleunigung erfährt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist angenähert proportional der Enzymmenge:

$$40 : 7{,}6 = 5{,}4$$
$$30 : 5{,}7 = 5{,}4$$

Viel weniger scharf tritt diese Proportionalität bei Versuchen mit d-Alanylglycin hervor, welche Abderhalden und Koelker (H. **55**, 416; 1908) angestellt haben. Die beiden folgenden Zahlenreihen finden sich a. a. O. S. 422.

2 ccm Dipeptidlösung = 0,001 normal 0,5 ccm Hefepresssaft 4 ccm Wasser

Minuten	Drehung	k . 10^4
0	+ 0,85° (extrap.)	—
12	0,80	22
31	0,71	25
62	0,63	22
86	0,53	24
118	0,49	23
190	0,36	20

2 ccm Dipeptidlösung = 0,001 normal 2,0 ccm Hefepresssaft 2,5 ccm Wasser

Minuten	Drehung	k . 10^4
0	+ 0,85° (extrap.)	—
12	0,70	70
31	0,54	64
62	0,38	56
86	0,28	56
118	0,19	55

Hier steigt also die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich langsamer als die Enzymkonzentration, ohne dass man jedoch von einer Gültigkeit der Schützschen Regel sprechen könnte.

Was den Einfluss der Substratkonzentration betrifft, so liegen an aktivem Material Versuche von E. Abderhalden und Koelker vor (H. **54**, 363; 1908).

Wir entnehmen den Tabellen folgende Zahlen:

	(1/330 mol.)	(1/250 mol.)	(1/200 mol.)
	3,0 ccm d-Alanyl-d-Alaninlösung	4,0 ccm d-Alanyl-d-Alaninlösung	5,0 ccm d-Alanyl-d-Alaninlösung
	1,0 ccm Hefepresssaft	1,0 ccm Hefepresssaft	1,0 ccm Hefepresssaft
	2,0 ccm Wasser	1,0 ccm Wasser	
Minuten	Winkel	Winkel	Winkel
4	— 1,36°	— 1,83°	— 2,15°
12	— 1,31	— 1,75	— 2,10
32	— 1,17	— 1,58	— 1,97
61	— 0,95	— 1,31	— 1,73
92	— 0,67	— 0,97	— 1,43
128	— 0,42	— 0,69	— 1,16
167	— 0,18	— 0,38	— 0,86
190	— 0,08	— 0,23	— 0,69
238	+ 0,03	+ 0,01	— 0,35
308	+ 0,05	+ 0,13	+ 0,02
357	+ 0,05	+ 0,12	+ 0,15
377	+ 0,11	+ 0,18	+ 0,29

Das zu diesen Versuchen angewandte Dipeptid war, wie diese Forscher mitteilen, nicht frei von Racemkörper; dadurch wird der Reaktionsverlauf und die Berechnung der beobachteten Zahlen komplizierter. Immerhin kann man sehen, dass bei den oben stehenden Messungen die in einer gewissen Zeit gespaltenen Dipeptidmengen von der Anfangskonzentration des Dipeptids in erster Annäherung unabhängig sind. Die nach der monomolekularen Formel berechneten Geschwindigkeitskonstanten würden also mit steigender Dipeptidkonzentration stark sinken, statt wie die Theorie fordert, von dieser Konzentration unabhängig zu sein. Wir finden diese Beziehung bei den meisten Enzymen in einem gewissen Konzentrationsgebiet resp. bei einem gewissen Konzentrationsverhältnis Substrat : Enzym. Es wurde bereits oben an Versuchen des Verf. gezeigt, wie stark Grösse und Art der Umsetzung mit der Alkalinität der Lösung variiert, und die Versuche von Abderhalden und Koelker (l. c. S. 378) bestätigen dies durchaus. In einer abschliessenden Untersuchung über die Dynamik des Trypsins und Erepsins wird also der Alkaligehalt der Lösungen weitgehend zu berücksichtigen sein. Wenn nämlich, worauf die vorliegenden Messungen hinweisen, gerade die Alkalisalze der Peptide bezw. Proteine der Spaltung unterliegen, also als „aktive Moleküle“ fungieren, so ist die Konzentration dieses Substrats nicht nur von derjenigen des Dipeptids, sondern auch von derjenigen des zugesetzten Alkalis abhängig, und man wird deswegen keine allgemeinen einfachen Beziehungen zur Reaktionsgeschwindigkeit finden, wenn man die Konzentration

des Dipeptids allein variiert. Vielmehr wird es sich lohnen zu untersuchen, in welcher Weise gleichzeitig die Konzentration des Alkalis geändert werden muss, damit die Forderung der Theorie — Unabhängigkeit der Reaktionskonstante von der Substratkonzentration — erfüllt ist.

Auch an Tri- und Tetrapeptiden haben Abderhalden und Koelker (H. **55**, 416; 1908) den Spaltungsverlauf untersucht. Studien zu derartigen höheren Polypeptiden sind nicht nur zur Charakterisierung von Polypeptiden geeignet, wo die Spaltungsgeschwindigkeit eine charakteristische Konstante bildet, sondern sie sind auch deswegen interessant, weil sie uns zeigen, wie sich der Reaktionsverlauf gestaltet, wenn, wie in genuinen Eiweisskörpern mehrere Spaltungen zugleich vor sich gehen. Ich führe als Beispiele zwei Versuchsreihen an, welche an d-Alanyl-glycyl-glycin erhalten wurden; ich habe sie, da die einzelnen Beobachtungen offenbar mit erheblichen Fehlern behaftet sind, graphisch interpoliert.

3,32 ccm Peptidlösung = 0,002 Mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 2,18 ccm H_2O			4,98 ccm Peptidlösung = 0,003 Mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 0,52 ccm H_2O		
Minuten	Winkel (interp.)	k . 10^4	Minuten	Winkel (interp.)	k . 10^4
0	1,70°	—	0	2,55°	—
20	1,15	85	20	1,80	76
40	0,70	96	40	1,20	82
60	0,41	103	60	0,80	83
80	0,20	116	80	0,55	83
			120	0,26	82

In der dritten Spalte stehen die nach der monomolekularen Formel berechneten Werte, welche, wie man sieht, nicht sehr erheblich mit der Zeit ansteigen.

Etwa gleichzeitig mit dem Verf. hat A. E. Taylor Versuche über die alkalische Proteolyse angestellt und zwar ebenfalls in der Absicht, die Resultate durch Wahl eines chemisch definierten Substrats reiner und eindeutiger zu machen. Er hat deshalb Protaminsulfat aus Salm nach Kossel hergestellt, und dasselbe mit Grüblerschem Pankreatin gespalten. Leider sind die Angaben über diese Versuche sehr knapp (On fermentation; Berkeley 1907 S. 152). Die Zahlen zeigten indessen, dass die Regel $x = \varkappa\sqrt{t}$ für Trypsin nicht gilt. Jede Versuchsserie lässt sich nach der für monomolekulare Reaktionen gültigen Formel berechnen; allerdings variiert diese Konstante, wenn in verschiedenen Versuchszeiten die Konzentration des Substrats verändert wird. Ferner ist unter gleichbleibenden äusseren Bedingungen die Geschwindigkeit der Protaminverdauung einfach und direkt proportional der Trypsinkonzentration. Die letztgenannten Versuche sind beim OH-Optimum ausgeführt.

Protamin 0,100 g in 50 ccm, Temperatur 40°.

Trypsinmenge in g.	0,008	0,006	0,004	0,003	0,002	0,001	0,0005
Verdauungszeiten t im Mittel	37	50	76,5	103	156	313	657
Trypsinmenge × t	296	300	306	309	312	313	328

Auch die Beziehung $x = \varkappa_s \sqrt{E}$ hat also hier keine Gültigkeit.

Im Anschluss an die hier referierten in vitro festgestellten Wirkungen der proteolytischen Enzyme mögen die Beziehungen Platz finden, welche Arrhenius (Medd. Nobel. Inst. **1**, Nr. 14 und H. **63**, 323; 1909) den zahlreichen Versuchen von E. S. London über die Verdauung im Hundemagen entnommen hat.

In bezug auf die experimentellen Einzelheiten verweise ich auf die Originalarbeiten von London (H. **45—60**). Es sind folgende Fälle zu unterscheiden:

1. Verdauung verschiedener Mengen Fleisch, eingeführt per os. Die von London festgestellte Tatsache, dass die in einer gegebenen Zeit verdaute Menge nicht proportional der zugeführten Menge von Nahrung ist, wird durch folgende Vorstellung verständlich:

„Nahe an der Magenwand liegen die ersten 100 g Fleisch in einer überall gleich dicken Schicht ausgebreitet. Innerhalb dieser liegt eine neue Schicht von 100 g Fleisch, deren Dicke etwas grösser ist als diejenige der ersten Schicht, weil ihre Oberfläche ungefähr wie der Querschnitt eines Conus nach innen abnimmt. Dann kommen weitere Schichten von je 100 g Fleisch und immer zunehmender Dicke. In diese Schicht diffundiert der Magensaft von der Magenschleimhaut hinein. Die Menge von Magensaft in jeder Schicht nimmt stark ab, und die Abnahme ist um so grösser je weiter innen die Schichten liegen. Dies beruht teils auf ihrer zunehmenden Dicke, teils auf den Diffusionsgesetzen, welche eine solche steigende Abnahme auch für gleich dicke Schichten verlangen. Daher kommt es, dass die innersten Schichten nicht merkbar verdaut werden, und die in einer gegebenen Zeit verdaute Menge mit der Menge der eingenommenen Nahrung nur bis auf ein Maximum zunimmt.“

Jede Schicht ist hinsichtlich der Verdauung unabhängig von jeder anderen, und die totale verdaute Menge ist gleich der Summe der in den einzelnen Schichten verdauten Mengen. Unter der vereinfachenden Annahme, dass die Verdauung in der äussersten Schicht immer gleich gross ist, wie viele Schichten noch innerhalb derselben liegen mögen, hat nun Arrhenius die Londonschen Versuche nach einer empirischen Formel berechnet. Dieselbe gibt die nach einer gewissen Zeit in den einzelnen Schichten verdauten Nahrungsmengen an und stellt das Versuchsmaterial sehr gut dar.

Mit Hilfe dieser Formel hat dann Arrhenius eine Tabelle über den zeitlichen Verlauf der Verdauung berechnet und dieselbe auch[1]) in Fig. 4 graphisch dargestellt.

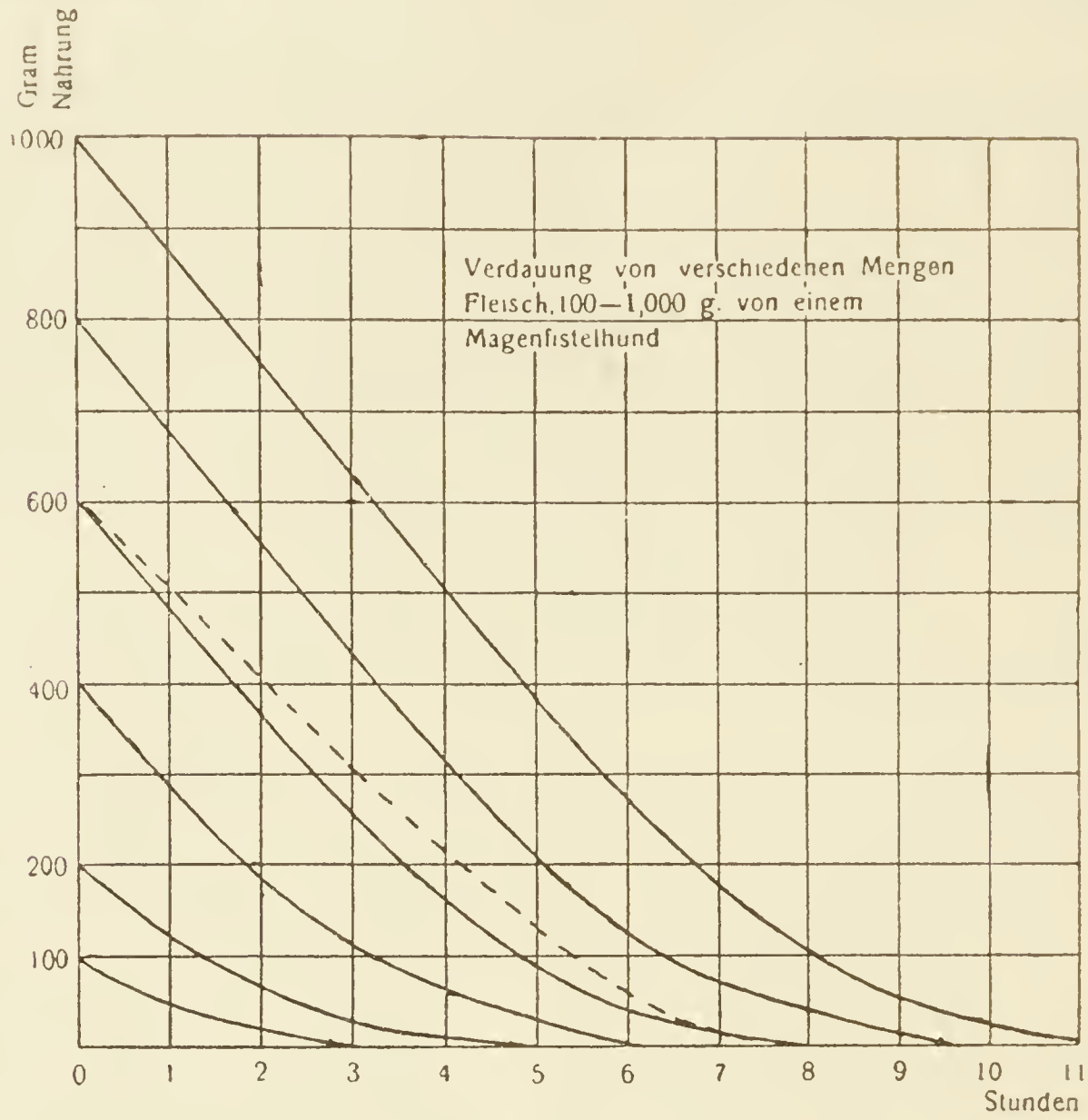


Fig. 4.

Aus der Kurve für 1000 g wurde noch besonders die nach einer gegebenen Anzahl von Stunden vorhandene Menge berechnet und in folgende Tabelle eingeführt:

Zeit in Stunden:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11,5
Unverdaute Menge:	1000	875	750	627	507	390	276	180	100	51	24	7	3
Differenz pro Std.:		125	125	123	120	117	114	96	80	49	27	17	

Wie ersichtlich ist die verdaute Menge anfangs sehr nahe proportional der Zeit, um nachher langsam abzunehmen.

[1]) Den zeitlichen Verlauf der Sekretion von Magensaft nach eingenommener Nahrung hat nach Versuchen von Chigin und Lobassow (Dissert. Petersburg 1896) Herzog zu berechnen versucht (Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4, 163; 1904).

Es handelt sich um die Menge Pepsin (gemessen durch die Anzahl ccm Magensaft und die spezifische Verdauungskraft desselben), welche einem aus Magenschleimhaut gebildeten Blindsack eines Fistelhundes, dem „kleinen Magen", sezerniert wird, wenn man Nahrung in den Magen einführt. Nach den Berechnungen von Herzog soll die Absonderung des Pepsins der monomolekularen Reaktionsformel folgen.

Wirklich sind die erhaltenen k-Werte bei Eingabe von fester Nahrung ziemlich konstant. Inwieweit aber die Pepsinmengen von seiten der russischen Beobachter einwandfrei gemessen und berechnet sind, entzieht sich meiner Beurteilung. Ganz neuerdings sind die Resultate von Chigin und Lobassow in einer (nach Drucklegung dieser Schrift erschienenen) Arbeit von Arrhenius (H. 63) besprochen worden.

Dies widerlegt scheinbar die Schützsche Regel, beruht aber darauf, dass in vivo die Verdauungsprodukte konstant abgeführt werden, während sie in vitro in der Lösung verbleiben und somit reaktionshemmend wirken.

Mit Hilfe der oben gegebenen Tabelle lässt sich eine sehr wichtige Regelmässigkeit auffinden. Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, dass für die Erreichung praktisch vollkommener Verdauung von 1000 g Fleisch 11,5 Stunden erforderlich sind. Man berechnet nun die zur Verdauung einer anderen Menge M nötige Zeit t, indem man von 11,5 Stunden die Zeit abzieht, welche zum Verdauen der Menge (1000—M) g Fleisch bei einer anfänglichen Menge von 1000 g nötig ist. In dieser Weise sind für wechselnde M-Werte die in der folgenden Tabelle stehenden Zeiten $t_{beob.}$ erhalten worden.

M	$t_{beob.}$	$t_{ber.}$	Diff.
1000	11,50	10,81	+ 0,69
900	10,70	10,26	+ 0,44
800	9,90	9,67	+ 0,23
700	9,09	9,05	+ 0,04
600	8,27	8,38	— 0,11
500	7,44	7,65	— 0,21
400	6,60	6,84	— 0,24
300	5,73	5,92	— 0,19
200	4,74	4,84	— 0,10
100	3,45	3,42	+ 0,03
50	2,40	2,42	— 0,02
25	1,55	1,71	— 0,16

Neben $t_{beob.}$ sind die Werte $t_{ber.}$ tabelliert, welche sich aus der Formel

$$t = 0{,}342 \sqrt{M}$$

ergeben. Es zeigt sich also, dass die zur praktisch vollständigen Verdauung der per os eingeführten Fleischnahrung nötige Zeit der Quadratwurzel aus der Nahrungsmenge sehr nahe proportional ist.

Dieses Quadratwurzelgesetz wurde nun bei zahlreichen Versuchsserien, und zwar bei verschiedener Nahrung wiedergefunden. Es gilt nicht nur für gewöhnliche Fleischnahrung, sondern, wie Arrhenius zeigt, auch bei der Verdauung von Gliadin (London, H. **56**, 394; 1908), Hühnereiweiss (London, H. **56**, 405; 1908) und Brot (London, H. **49**, 359; 1906), und es ist deshalb von der grössten Wichtigkeit für die Berechnung der Verdauungszeit von festen Nahrungsmitteln überhaupt.

2. Verdauung von direkt in den Magen durch Fistel eingeführtem Fleisch. Wird die Nahrung per os eingenommen, so findet eine reflektorische Absonderung von Magensaft statt, welche die Verdauung stark beschleunigt. Bei Einführung durch die Fistel hingegen wird die Absonderung von Magensaft erst allmählich durch den Reiz des Fleisches auf die Magenwand hervorgerufen, und die Absonderung nimmt anfangs mit der

Zeit zu, und zwar, wie die folgende Rechnung zeigt, in der Weise, dass die Menge derselben im Magen etwa der Zeit nach der Einführung des Fleisches proportional ist.

Ist nämlich die Verdauung der anwesenden Menge von Magensaft proportional, und diese Menge wiederum der genannten Zeit, so ist die pro Zeiteinheit verdaute Menge $\frac{dx}{dt}$ teils der Zeit, t, teils auch der noch vorhandenen Menge $(M - x)$ von Fleisch (wenn am Anfang des Versuches die Menge M zugeführt wurde) proportional, oder in gewöhnlicher mathematischer Ausdrucksweise:

$$\frac{dx}{dt} = 2\,k\,.\,t\,(M - x),$$

woraus folgt:

$$\log \frac{M}{M - x} = k\,t^2$$

Nach dieser Formel sind die folgenden Versuche von London und Pewsner berechnet.

A. Fütterung des Hundes per fistulam. Augen und Schnauze bedeckt.

t Stunden	Unverdaute Menge $(M - x)$	$(M - x)$ ber.	Differenz
0	100	100	—
2	84	84,7	— 0,7
4	56	51,5	+ 4,5
6	20	22,5	— 2,5
8	7	7,0	0
	0	3,5	— 3,5

B. Fütterung per fistulam. Augen und Schnauze unbedeckt.

t Stunden	Unverdaute Menge $(M - x)$	$(M - x)$ ber.	Differenz
0	100	100	—
2	84	83,7	+ 0,3
4	53	49,1	+ 3,9
6	18	20,1	— 2,1
8	5	5,8	— 0,8
9	0	2,7	— 2,7

Die Konstante hatte in dem Versuch A den Wert $k = 0{,}0180$, in dem Versuch B den Wert $k = 0{,}0193$.

3. Fragen wir nun, wie sich der gesamte zeitliche Verlauf der Verdauung gestaltet (also nicht nur nach der zur lokalen Verdauung nötigen Zeit), so lässt sich allgemein sagen, dass die Verdauung dem für monomolekulare Reaktionen gültigen Gesetz folgt, sofern es sich um kleine Nahrungsmengen (also nach obiger Annahme nur um eine unmittelbar an der Magenwand liegende Schicht handelt). Dies zeigen folgende Beispiele:

Verdauung von gekochtem Eiweiss, 200 g.

t	(100 — x)	(100 — x) ber.	Diff.
0	100	100	—
1	70	65	+ 5
2	32	42	— 10
3	28	27	+ 1
4	18	18	0
5	15	12	+ 3
6	4	7	— 3
(7	0	5	— 5)

Verdauung von Fleisch, 200 g.

t	(100 — x)	(100 — x) ber.	Diff.
0	100	100	—
1	60	56	+ 4
2	31	32	— 1
3	15	18	— 3
4	5	10	— 5
5	0	6	— 6

Unter (a — x) ist die Menge des zur Zeit t im Magen vorhandenen, noch unverdauten Eiweisses angegeben. Die berechneten Ziffern sind nach der Formel ermittelt:

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{100}{100 - x}$$

Die gleiche Formel gilt für die Verdauung gelöster Kohlehydrate (Amylodextrin).

4. Auch für die Resorption einer Zuckerlösung im Darm gilt das monomolekulare Reaktionsgesetz.

Wenn eine Glukoselösung in den Darm eingeführt wird, so nimmt der Darm daraus Wasser auf, falls die Lösung verdünnt ist, gibt der Lösung aber Wasser ab, wenn dieselbe konzentriert ist. Diese Wasserabgabe aus dem Körper erreicht ein Maximum, welches der Fähigkeit des Körpers, Wasser abzugeben entspricht; es beträgt 900 ccm. Aus den Londonschen Versuchen hat Arrhenius die Konzentration, bei welcher kein Wasser abgegeben oder aufgenommen wird, zu 10,5% Glukose gefunden. Es zeigte sich, dass, wie zu erwarten war, die Wasseraufnahme aus dem Darm dem Konzentrationsüberschuss über 10,5% proportional ist. Es muss also das Gesetz gelten:

$$\log \frac{900}{900 - W} = k\ (C - 10{,}5) \cdot t$$

wo W die Wasseraufnahme aus dem Darm und C — 10,5 den Konzentrationsüberschuss über 10,5% bezeichnet.

Labenzym (Chymosin).

Kasein wird bei der Labung in Parakasein verwandelt (vergl. S. 32); ob gleichzeitig eine Komponente, etwa eine Albumose aus dem Kaseinmolekül abgespalten wird, ist eine viel behandelte Frage. Dieser vermuteten teilweisen Hydrolyse wegen, und auf Grund des gemeinsamen Vorkommens von Pepsin und Chymosin reiht man letzteres den eigentlichen proteolytischen Enzymen an.

Es sei daran erinnert, dass die Labgerinnung der Milch aus zwei Vorgängen besteht (Hammarsten): Chymosin beschleunigt nur den Übergang Kasein-Parakasein, eine Umwandlung, welche auch ohne Calciumsalze eintritt. Calicumsalze sind nur für die Fällung des Gerinnsels (Parakaseins) nötig, wozu andererseits kein Lab erforderlich ist.

Es liegt demgemäss nahe, zu erwarten, dass sich die Gerinnungszeit aus zwei Summanden zusammensetzt: 1. Der Zeit, deren es bedarf, damit das Kasein annähernd vollständig in das Parakasein übergeht, der Umwandlungszeit, und 2. der Zeit, welche zur Ausscheidung des sichtbaren Labgerinnsels erforderlich ist, der Ausscheidungszeit. Eine solche Annahme hat Fuld vertreten (Hofm. Beitr. 2, 169; 1902). Nach ihm beträgt die Ausscheidungszeit je nach der Temperatur der Parakaseinlösung mehrere Tage bis wenige Minuten und weniger, und soll bei den oben referierten Versuchsbedingungen gegenüber der langen Umwandlungszeit so sehr zurücktreten, dass sie ohne Bedenken vernachlässigt werden kann. Dagegen halten Reichel und Spiro in ihrer letzten eingehenden Untersuchung eine solche Annahme wie die Fuldsche nicht berechtigt, und sind der Ansicht, dass der ganze Labungsprozess seinem zeitlichen Verlauf nach als einheitlich betrachtet werden muss. (Hofm. Beitr. 8, 15; 1906).

Für den Labungsvorgang gilt folgendes Gesetz: [E] t = konst.

Das Produkt aus Enzymkonzentration [E] und Gerinnungszeit t ist konstant. Diese Beziehung ist zuerst von Segelcke und Storch (Ugeskrift for Landmaend 1870) gefunden und später von Hansen und Soxhlet ausführlich bestätigt worden (Milchzeitung 1877). Die eingehendsten Prüfungen der Labwirkung verdankt man Fuld sowie Reichel und Spiro.

E. Fuld fand bei 40° folgende Zahlen (Hofm. Beitr. **2**, S. 172), welche den Beweis der scharfen und allgemeinen Giltigkeit des Zeitgesetzes auch für kleine Labdosen erbrachten.

Labmenge	Gerinnungszeit t Sekunden	Produkt
0,4	6	24
0,4	6,6	26
0,2	13	26
0,1	25	25
0,8	6	48
0,4	17	44
0,2	22	44
0,1	45	45

Nach C. Gerber (Soc. Biol. **63**, 575; 1907), welcher neuerdings in zahlreichen Arbeiten den Labungsvorgang gründlich studiert hat, ist es beim Arbeiten mit Labferment der Handelspepsine wesentlich, dass man Temperaturen zwischen 25° und 30° einhält, wo sich das Enzym unter normalen Bedingungen befindet. Innerhalb dieser Temperaturgrenzen findet Gerber das Gesetz von Segelke-Storch für Parachymosin streng gültig.

Tropfen Parachymosin, E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Koagulationszeit, t	29′ 66″	14′ 75″	10′ 30″	7′ 60″	(3)	5′ 50″	4′ 50″	3′ 66″	3′ 16″	2′ 92″
E t	29,6	29,5	31	30,3	„	33	31,5	29,3	28,1	29,2

Auch Madsen hat die Dauer der Milchgerinnung untersucht, und zwar in analoger Weise wie die Pepsinwirkung (siehe Arrhenius, Immunochemie S. 47).

Er setzt z. B. verschiedene Labmengen L zu einer bestimmten Menge Milch, stellt die Mischungen, die in Probierröhren enthalten sind, in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur, nimmt sie nach der Zeit t heraus, kühlt sie schnell ab und prüft, welches die geringste Menge L ist, die zur Gerinnung genügt.

Koagulation von Milch durch verschieden konz. Lablösungen bei 36,55°.

Minuten	L	L . t	Minuten	L	L . t
4	0,08	0,32	35	0,007	0,25
6	0,05	0,30	50	0,005	0,25
9	0,033	0,30	70	0,004	0,28
11	0,024	0,26	80	0,0032	0,26
12	0,019	0,23	100	0,0028	0,28
14	0,0175	0,25	120	0,0025	0,30
20	0,013	0,26	180	0,00185	0,33
25	0,010	0,25	240	0,0017	0,41
30	0,0007	0,21			

Für Parachymosin hat Bang (Pflüg. Archiv **79**) die Beziehung $[E]\,t = \text{konst.}$ nicht gültig befunden.

Durch eine sorgfältige Untersuchung haben Reichel und Spiro (Hofm. Beitr. **7**, 485; 1905) festgestellt, dass das Verhältnis zwischen Labmenge L und Labungsdauer t sich allgemein durch die Formel darstellen lässt:

$$L^n \,.\, t = \text{konst.}$$

Der zu L gehörige Exponent n ändert sich mit Art und Menge der gleichzeitig in Lösung befindlichen Körper, und in einer Flüssigkeit von der Zusammensetzung der Milch nimmt der Exponent n gerade den Wert 1 an, so dass hier das Gesetz in seiner einfachsten Form

$$L \cdot t = \text{konst.}$$

gültig ist.

Bei den folgenden Versuchen wurden die Lösungen durch Verdünnung von Molke hergestellt, deren eigene Labwirkung gegen diejenige des zugesetzten Enzyms nicht in Betracht kam.

Milch	ccm 35% Lab mit Molke verdünnt	Molke	Labungszeit t in Sekunden		
			Molke I	Molke II	Molke III
0,5	0,5	4,0	22	22	33
1,0	„	3,5	17	22,5	27
1,5	„	3,0	18	27	28
2,0	„	2,5	17	25,5	26,5
2,5	„	2,0	18	24,5	25,5
3,0	„	1,5	16	26	26
3,5	„	1,0	16	26	24
4,0	„	0,5	15	25	26
4,5	„	—	16	24	27

Wie man sieht, ist die Konstante L . t bezw., da L hier stets dasselbe ist, die Gerinnungsdauer, unabhängig von der Konzentration der Lösung an Milch (Kasein) von 20% angefangen bis zu 90%.

Wurde die Molke durch 0,9prozentige Kochsalzlösung ersetzt, so war die Konstanz der Zeitdauer schon bei geringerer Verdünnung, und zwar noch stärker, zu beobachten.

Ausgedehntere Versuchsreihen zeigten dann, dass die Differenz zwischen den Gerinnungszeiten verdünnter und konzentrierter Milch der Differenz der Verdünnungszustände annähernd einfach proportional war. Bedeutet also V das Volumen der verdünnten Milch, M das Volumen der unverdünnten Milch, t und t' die Gerinnungszeiten in beiden Medien, so ist

$$\left(t - t'\right)\left(\frac{M}{V - M}\right) = \text{konst.}$$

Ein Auszug aus der Tabelle VII der Reichel-Spiroschen Arbeit zeigt dies.

Lab	Milch	Molke	Zeit	$\left(t - t'\right)\left(\frac{M}{V - M}\right)$
1,0	0,2	8,8	110	1,60
1,0	0,6	8,4	50	1,81
1,0	1,0	8,0	39	1,93
1,0	2,0	7,0	28,6	1,75
1,0	4,0	5,0	24	1,60
1,0	8,0	1,0	22	1,60

Für den Einfluss der Ca-Ionen auf die Labungsdauer wurde gleichfalls eine einfache und bemerkenswerte Beziehung gefunden:

$$Ca^{\cdot\cdot} \times t = \text{konst.}$$

Milch	$CaCl_2$	Zeit t für Lab			Konstanzzahl $= Ca^{\cdot\cdot} \times t$ für Lab		
ccm	‰	1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25
8,0	—	95	48	24	57,0	28,8	14,4
8,0	0,05	88,6	45,6	23	57,6	29,6	15,0
8,0	0,1	79	41,6	22	55,3	29,1	15,4
8,0	0,2	66,4	36	19	53,1	28,8	15,2
8,0	0,5	48	26,4	14	52,8	29,0	15,4
8,0	1,0	30	18,2	10,6	48,0	29,1	17,0
8,0	2,0	17	11	6,8	44,2	28,6	17,7
8,0	5,0	10	7,4	5,4	56,0	41,4	30,2
8,0	10,0	13	9,2	6,2	137,8	97,5	65,7
8,0	20,0	22	15	8,6	453,2	309,0	177,2

Die Konstanzzahl, welche sich bis zu etwa 2‰ Ca ziemlich unverändert hält, ist unter der Annahme berechnet, dass der Gehalt der Milch an Ca-Ionen 0,6‰ beträgt; es muss dann etwa 15% des gesamten Milchkalks ionisiert sein.

Ferner ist, wie in einer weiteren Arbeit (Hofm. Beitr. 8, 15: 1906) festgestellt wurde, die Labwirkung a allgemein (nicht nur im Gerinnungspunkte)

CHEMICAL SOCIETY BURLINGTON HOUSE, W.

der Enzymmenge L und der Labungsdauer t direkt proportional, was durch die Formel ausgedrückt wird:

$$a = L \,.\, t \,.\, \text{konst.}$$

Die neuere Behauptung von H. Köttlitz (Arch. intern. de Physiol. **5**, 140; 1907), dass die Schützsche Regel auch für die Labwirkung gelte, vermag das Ergebnis der Reichel-Spiroschen Untersuchung keineswegs zu entkräften.

Man hat mehrfach versucht, die Zeitgesetze, welche einerseits für die Labwirkung, andererseits für die Pepsinwirkung ermittelt wurden, als Kriterien für die viel umstrittene Identität des Chymosins und Pepsins zu verwerten.

Die Diskussion hierüber gehört nicht in das Kapitel über die chemische Dynamik der Enzyme; soviel kann aber gesagt werden, dass es wohl besonders seit der umfassenden Untersuchung von Hammarsten (H. **56**, 18; 1908) nicht mehr möglich ist, die Milchgerinnung einfach als eine Pepsinwirkung anzusehen. Der Einfluss der Konzentration auf die Labung und Verdauung ist, wie auch der Einfluss der Temperatur, so ungleich, dass man wenigstens annehmen müsste, dass zwei verschiedene, enzymatisch wirksame Gruppen in einem Molekül vereinigt sind. Letztere Annahme lässt sich vorläufig, solange eine Reindarstellung der Enzyme nicht geglückt ist, weder widerlegen noch beweisen, und ist vorläufig auch von untergeordneter Bedeutung.

Fibrinferment.

E. Fuld (Hofm. Beitr. **2**, 514; 1902) vermischte das Plasma von Vogelblut mit der Fermentlösung (Extrakt eines Muskels mit 0,8 %iger Kochsalzlösung). Die Gerinnungsgeschwindigkeit stieg langsamer als der Enzymgehalt; die Schützsche Regel stimmte annähernd; genauer werden die Beobachtungen durch die Beziehung dargestellt:

$$\frac{v_1}{v_2} = \left(\frac{E_1}{E_2}\right)^{0{,}585}$$

wo v_1 und v_2 die Gerinnungsgeschwindigkeiten, E_1 und E_2 die Enzymkonzentrationen bedeuten. Für lange Gerinnungszeiten, also kleine Enzymkonzentrationen gilt diese Beziehung nicht mehr; die Gerinnungsdauer nimmt dann unverhältnismässig stark zu.

Von Martin (J. of Physiol. **32**, 207; 1905) wurde besonders festgestellt, dass die gleiche Gesetzmässigkeit, welche für Chymosin und zahlreiche andere Enzyme gefunden worden ist, nämlich dass dem gleichen Produkt E . t die gleiche Wirkung entspricht, welche Werte E und t auch annehmen mögen, auch für das Fibrinferment Gültigkeit besitzt.

Zymase.

Obwohl die „Zymase“ in Hefepresssaft von einer ausserordentlich grossen Menge der verschiedensten Stoffe begleitet wird und also vom Zustand der

Reinheit wohl noch weiter entfernt ist als irgend ein anderes Enzym, so ist es in letzter Zeit — durch die Arbeiten von Buchner und Meisenheimer sowie von Harden und Young — doch gelungen, wichtige Einblicke in den Chemismus der alkoholischen Gärung zu gewinnen.

Studiert man quantitativ das Auftreten der Endprodukte Alkohol und Kohlensäure im zuckerhaltigen Hefepresssaft, wie Verf. dies getan hat (H. 44, 53; 1905) so findet man folgendes:

Der Ausdruck $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} = k$ zeigt sich während der ersten Hälfte der Reaktion ziemlich konstant, später sinken die k-Werte stark, wozu jedenfalls zwei Ursachen wesentlich beitragen, nämlich erstens das Ausfallen von Eiweisskörpern, welche einen Teil der Gärungsenzyme mit sich reissen, und zweitens die Veränderung eines Aktivators der Zymase; dieser — aus organischen Verbindungen der Phosphorsäure bestehend — wird durch die Lipase des Hefepresssaftes angegriffen, und somit verarmt der Presssaft allmählich an diesem für die alkoholische Gärung so wichtigen „Ko-Enzym".

Die Menge der pro Zeiteinheit entwickelten Kohlensäure wurde teils aus dem Gewichtsverlust der Lösung, teils volumetrisch bestimmt.

4 g Glukose in 20 ccm Saft.

Minuten	x g CO_2	a — x	k · 10^4
0	—	1,800	—
80	0,078	1,722	2,4
315	0,299	1,501	2,51
379	0,360	1,440	2,56
505	0,460	1,340	2,54
1024	0,779	1,021	2,41
1180	0,810	0,990	(2,20)
1544	0,899	0,901	(1,95)
2119	0.955	0,845	(1,55)

Während etwa 18 Stunden ist hier die Reaktionsgeschwindigkeit ziemlich konstant; es ist dies ein günstiger Fall; sonst hält sich der Presssaft, wie auch die nachfolgenden Tabellen zeigen, nur etwa 6—8 Stunden unverändert.

Den Einfluss der Konzentration des Substrates behandeln die folgenden Versuche.

20 ccm Saft + 8 g Glukose in 20 ccm Lösung.

Minuten	x g	a — x	k · 10^5	Minuten	x g	a — x	k · 10^5
		3,909				3,909	
0		3,900		0	—	3,900	
161	0,078	3,822	5,44	160	0,0815	3,8185	5,38
260	0,120	3,780	5,24	257	0,1195	3,7805	5,24
358	1,161	3,739	5,11	355	0,159	3,781	5,05
404	0,181	3,719	5,10	404	0,180	2,720	5,10
			5,21				5,19

20 ccm Saft + 2 g Glukose in 20 ccm Lösung.

Minuten	x g	a — x	k · 10^4	Minuten	x g	a — x	k · 10^4
		0,977	—			0,977	—
0	0	0,968	—	0	0	0,962	—
167	0,0855	0,8825	2,40	153	0,081	0,881	2,50
240	0,123	0,845	2,46	260	0,123	0,839	2,27
332	0,152	0,816	2,29	331	0,182	0,780	2,75
			2,38				2,51

Ausser dieser Versuchsreihe liegen 3 weitere vor, bei welchen die Konzentration des Zuckers im Verhältnis 4 : 1 variiert wurde. Die Konstanten verhalten sich wie folgt:

	$k_1 \cdot 10^5 : k_2 \cdot 10^5$
Nr. 4	5,2 : 24,1 = 1 : 4,7
„ 5	2,5 : 12,0 = 1 : 4,8
„ 7	15,0 : 75,0 = 1 : 5,0
„ 6	20,0 : 97 = 1 : 4,85

Wie ersichtlich, sind die Geschwindigkeiten von der Substratkonzentration nicht, wie es die Theorie fordert, unabhängig; sie sind auch den Anfangskonzentrationen a nicht umgekehrt proportional, und k a ist somit keine konstante Grösse, sondern wird im untersuchten Gebiete um so grösser, je kleiner a wird. In allen 4 Versuchsserien verhält sich $a_1 : a_2 = 4 : 1$.

	$k_1 a_1 \cdot 10^6$	$k_2 a_2 \cdot 10^6$
Nr. 4	208	244
„ 5	100	120
„ 7	600	750
„ 6	800	990

Während im allgemeinen die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional mit den Enzymkonzentrationen oder langsamer als diese steigen, nimmt die Gärungsgeschwindigkeit schneller zu als die Konzentration des Presssaftes, durchgehends aber langsamer als das Quadrat derselben.

Berechnet man den Exponenten n nach der Gleichung

$$\frac{\ln k_1 - \ln k_2}{\ln c_1 - \ln c_2} = n$$

so findet man, dass n bei gleichem Zuckergehalt mit abnehmendem k, also mit abnehmender Konzentration der Zymase steigt:

$k_1 \cdot 10^6$	n
100	1,29
86	1,33
35	1,52
12	1,67

Die Zahlen scheinen darauf hinzudeuten, dass bei sehr hoher Gärkraft Proportionalität zwischen der Konzentration des Presssaftes und der Gärungsgeschwindigkeit erreicht würde.

Verdünnt man schliesslich zuckerhaltigen Presssaft, vermehrt also das Volumen und hält die absoluten Mengen Presssaft und Zucker konstant, so findet man folgende Beziehungen:

a) { Konzentration: 32 : 52 = 1 : 1,63
Geschwindigkeit: 192 : 282 = 1 : 1,47

b) { 20 : 30 : 50 = 1 : 1,5 : 2,5
120 : 188 : 315 = 1 : 1,57 : 2,63

Nimmt man das Mittel aus diesen beiden Versuchen, so ergibt sich, dass im untersuchten Konzentrationsgebiet eine angenäherte Proportionalität zwischen Konzentration und Geschwindigkeit besteht.

Bereits vor den erwähnten Versuchen mit Hefepresssaft hatte Aberson (Rec. Trav. chim. Pays-Bas. **22**, 78; 1903) den Verlauf der alkoholischen Gärung der Glukose mit lebenden Hefezellen studiert.

Dem zu erwartenden Reaktionsgesetz schliessen sich die Ergebnisse seiner zahlreichen, und, wie es scheint, umsichtig angestellten Versuche nicht an, dagegen folgen sie auffallend gut der entsprechenden Formel (2) von Henri.

Minuten	Drehung der Glukoselösung	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$k_H = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$
0	34,1		
31	33,0	45,9	90,0
91	30,9	47,0	90,0
125	29,7	48,0	90,0
213	26,7	50,6	90,0
306	23,5	51,2	91,0
393	20,9	54,1	90,0
514	17,7	55,4	90,3

Auszug aus der Tabelle S. 97
Temp. 29,3°

Volumen 600 ccm
Anwesende Hefemenge:
0 Minuten: 0,288 g Trockenhefe in 50 ccm.
514 „ : 0,294 g Trockenhefe in 50 ccm

Das Ansteigen der theoretischen Konstante hat seinen Grund in der verzögernden Wirkung der Glukose. Aus der gleichen Ursache ist auch weder die Konstante k_H noch die Konstante k unabhängig von der Anfangskonzentration der Glukose. Vielmehr nimmt k_H mit steigender Substratkonzentration ab.

Wir werden später sehen, dass auch der Alkohol einen verzögernden Einfluss auf die Reaktion ausübt. Vergärt man gleiche Zuckerlösungen mit verschiedenen Hefemengen, so ergibt sich volle Proportionalität zwischen Hefemenge und Reaktionsgeschwindigkeit (l. c. S. 84).

g Hefe	60	20	g Hefe	25	15
k	271	93,4	k	165	104

Gleichfalls im heterogenen System verliefen die Gärungsversuche, welche Herzog (H. **37**, 149, 1902) und Grigoriew (H. **42**, 299, 1904) angestellt haben.

Wie die Gärung bei Anwendung von Dauerhefe verläuft (dieselbe war allerdings glykogenhaltig) zeigt folgende Tabelle aus der Arbeit von Herzog:

Konzentration: 1,136 g Glukose (a = 1) und 1,2 g Zymase (Dauerhefe) in 100 ccm. Temp. 24,5°.

t	a − x	$\frac{10^6}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{10^6}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$
120	0,961	144	141
240	0,931	129	133
1200	0,687	137	117
1440	0,627	140	118
1740	0,560	145	117
2690	0,403	146	111
3000	0,365	146	108
4140	0,271	137	99

Der Exponent n der Enzymkonzentration, mit welchem die Reaktionsgeschwindigkeit wächst, fällt bei den Versuchen mit Dauerhefe grösser aus, als bei den mit Presssaft angestellten. Die folgende kleine Tabelle macht ersichtlich, wie sich lebende Hefe, Acetondauerhefe und Presssaft in dynamischer Hinsicht verhalten.

	Lebende Hefe	Acetondauerhefe	Zymaselösung (Presssaft)
Reaktionskonstante k =	$\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$	$\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ oder $\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$	$\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ (Vergl. l. c. S. 62)
Einfluss der Hefemenge bezw. Konzentr. der Zymase $n = \frac{\log k_1 - \log k_2}{\log c_1 - \log c_2}$	1	2 (Herzog)	1,67—1,29
Einfluss der Zuckerkonzentration a	k . a wächst mit steigendem a	k . a wächst im untersuchten Gebiet mit abnehmendem a	

Bekanntlich waren Buchner und Meisenheimer zur Ansicht gelangt, dass die Zymase im weiteren Sinne ein Gemisch ist aus wenigstens 2 Enzymen, nämlich der Zymase im engeren Sinne, welche die gärungsfähigen Hexosen zu Milchsäure spalten soll, und der Laktacidase, welche die gebildete Milchsäure zu Alkohol und Kohlensäure abbaut. Über die chemischen Teilvorgänge bei der Verwandlung von Zucker in Alkohol und Kohlensäure ist viel diskutiert worden. Da schwerwiegende Gründe gegen das intermediäre Auftreten von Milchsäure geltend gemacht werden können (man vergleiche die kritische Übersicht von Buchner und Meisenheimer in Landw. Jahrbücher **38**, Ergänz. Bd. 5, 265; 1909), so lässt sich auch über die Zahl und Art der beteiligten Enzyme noch nichts Endgültiges sagen.

Dass ein „Ko-Enzym“ bei der Gärung eine wichtige Rolle spielt, muss als eine nunmehr sicher gestellte Tatsache gelten, ebenso dass Zusätze von Phosphaten zu Glukose-haltigem Hefepresssaft nicht nur eine Beschleunigung der Gärung hervorrufen, sondern auch die totale Gärkraft erhöhen, d. h. die Mengen Alkohol und Kohlensäure steigern, welche durch den Presssaft aus einer gegebenen Zuckermenge überhaupt gebildet werden können (Harden und Young, Proc. Roy. Soc. **77**, 405; 1905; **78**, 369; 1906; **80**, 299; 1908).

Die Wirkungsweise der Phosphate ist dagegen noch hypothetisch. Nach den eben genannten Autoren ist die Gegenwart von Phosphaten für die alkoholische Gärung der Glukose durch Presssaft wesentlich, da dieser Vorgang nach folgender Gleichung verläuft:

1. $2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,R_2HPO_4 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O.$

Dieser Vorgang soll nur in der Gegenwart von Enzym und Ko-Enzym stattfinden; Phosphate allein sollen in Abwesenheit von Ko-Enzym nicht imstande sein, die Gärung in einer Mischung von Enzym und Glukose hervorzurufen. Das Hexosephosphat unterliegt nach Harden und Young der Hydrolyse:

2. $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,R_2HPO_4$

und der Betrag, in welchem diese zweite Reaktion statthat, soll den Betrag der gesamten Gärung bestimmen.

Die Beschleunigung der Gärung durch Phosphate haben die englischen Forscher quantitativ studiert. Von den Ergebnissen, welche sie selbst in etwas ungewöhnlicher Form tabelliert und durch Kurven dargestellt haben, seien folgende angeführt (l. c. S. 307).

Minuten	Entwickelte CO_2-Menge in Gegenwart von n ccm 0,3 mol. normalem Kaliumphosphat		
	n = 0 ccm	n = 10 ccm	n = 15 ccm
5	4,0	11,1	7,7
10	7,2	27,1	17,4
15	11,4	47,3	29,5
20	15,0	69,7	45,6
25	19,3	87,1	64,0
30	22,9	93,7	83,4
35	27,2	98,3	103,8
40	30,4	103,0	120,5
50	—	111,7	139,2

Es ist deutlich, dass ein ausgesprochenes Optimum der Phosphatkonzentration existiert, über welches hinaus Zusätze von Phosphaten die Gärungsgeschwindigkeiten wieder vermindern.

Katalasen.

Die Spaltung von Wasserstoffsuperoxyd, welche unter der Einwirkung unbekannter Bestandteile des Tier- und Pflanzenkörpers eintritt — man bezeichnet sie mit O. Loew als Katalasen — ist quantitativ so einfach zu verfolgen, dass dieser enzymatische Vorgang mit Vorliebe studiert wurde, und nun zu den best bekannten gehört. Besonders aus tierischen Fettgeweben lassen sich Lösungen darstellen, welche ausser ihrer Spaltfähigkeit Wasserstoffsuperoxyd gegenüber nur wenig andere enzymatische Wirkungen zeigen, und überhaupt nur wenig organische Substanz enthalten, also verhältnis-

mässig rein sein müssen. Auch aus Blutserum, aus pflanzlichen Organen usw. kann man durch Fällung mit Alkohol und geeignete Behandlung des Niederschlags Präparate erhalten, welche pro Gewichtseinheit das Hydroperoxyd rasch zersetzen (O. Loew, Rep. U. S. A. Dep. of Agric. Nr. **68**, 1901. — Senter, Z. f. physik. Chem. **44**, 257; 1903 und Proc. Roy. Soc. **74**, 201; 1904. — E. J. Lesser, Z. Biol. **48**, 1; 1906. — L. van Italie, Soc. Biol. **60**, 150; 1906. — Kastle und Loevenhart, Amer. Chem. J. **29**, 563; 1903. — L. v. Liebermann, Pflüg. Arch. **104**, 176; 1903 und Chem. Ber. **38**, 1524; 1905).

Die Katalase folgt den theoretisch einfachsten Formeln und Beziehungen mit so grosser Annäherung wie wenig andere Enzyme, sei es, dass der einfache chemische Vorgang hier besonders einfache Verhältnisse bedingt, sei es, dass der relativ hohe Reinheitsgrad grössere Komplikationen ausschliesst. Die wichtigsten allgemeinen Beziehungen sind die folgenden:

Die enzymatische Spaltung von Hydroperoxyd in neutraler oder saurer Lösung ist eine Reaktion 1. Ordnung.

In verdünnten Hydroperoxyd-Lösungen folgt die Spaltung genau dem Massenwirkungsgesetz. Aus den zahlreichen hierüber vorliegenden physikalisch-chemischen Messungen entnehmen wir einige Zahlenreihen den Arbeiten von G. Senter und von H. Euler.

Blutkatalase. Senter, l. c. S. 282.

$^1/_{106}$ molare H_2O_2-Lös.

Minuten	a — x	k · 10^4	T = 0°
0	46,1	—	
5	37,1	190	
10	29,8	192	
20	19,6	190	
30	12,3	193	
50	5	194	

Pilzkatalase. Euler, Hofm. Beitr. **7**, S. 1.

$^1/_{20}$ molare H_2O_2-Lös.

Minuten	a — x	k · 10^4	T = 15°
0	8,0	—	
6	6,9	107	
12	5,8	116	
19	5,0	107	
55	2,5	100	

Auch Issajew (H. **42**, 102, 1904) erhielt mit verdünnten H_2O_2-Lösungen gute Konstanz der k-Werte; in konzentrierteren Lösungen (0,01 n. und mehr) nehmen die Konstanten ab.

Die Katalasen sind durchweg empfindlich gegen grössere Konzentrationen von H_2O_2, Präparate ungleicher Herkunft in verschieden hohem Grade; so wird Blutkatalase schon in etwa 0,01 normaler Lösung merkbar zerstört (vielleicht oxydiert), und zwar bei höherer Temperatur natürlich rascher als bei niedriger, so dass bei 30° die Werte für k schon sehr stark fallen. Es empfiehlt sich deshalb, mit Katalase bei niedriger Temperatur zu arbeiten.

Von der Konzentration des Hydroperoxyds sind die Reaktionskonstanten ziemlich unabhängig, wie es die Theorie erfordert; es werden also durch gleiche Enzymmengen in der Zeiteinheit prozentisch gleiche Peroxydmengen zersetzt. Senter gibt (l. c. 283) folgende Zusammenstellung

$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^3$	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^3$
1/290 n.	120	1/126	175	1/106	192
1/1100 n.	122	1/460	188	1/440	225

Über den Einfluss der Enzymkonzentration geben die folgenden Ergebnisse von Senter Aufschluss.

Konzentrationen E im Verhältnisse	3	6	8	24
$k \cdot 10^4$	28	58	72	230
k : C	9,3	9,7	9,0	9,6

Innerhalb der Versuchsfehler sind also die Reaktionsgeschwindigkeiten in sehr verdünnter (1/480 molarer) H_2O_2-Lösung proportional der Enzymkonzentration. Bei stärkeren Peroxydlösungen hat Senter Abweichungen gefunden. Während $k \cdot 10^4$ in den schwachen Katalaselösungen etwa 100 beträgt, ist dieser Wert in Gegenwart der 3-fachen Enzymmenge etwa 360. Dass unter diesen Umständen die Reaktionsgeschwindigkeit schneller wächst als die Enzymkonzentration, wird durch Versuche von Bach bestätigt, welcher die Dymanik der Katalasen mit einem Präparat aus Rinderfett untersucht hat (Chem. Ber. **38**, 1878; 1905).

Issajew hat bei 1/210 norm. Peroxydlösungen Abweichungen von der Proportionalität in entgegengesetzter Richtung gefunden, d. h. die Geschwindigkeit nahm langsamer zu als die Enzymkonzentration. Indessen dürfte diese Hefekatalase wie alle Hefeenzyme, sehr unrein gewesen sein.

Wie schon Loew gefunden hat, sind Katalasen ausserordentlich säureempfindlich. Auch quantitativ ist die Wirkung zugesetzter Säuren mehrfach studiert worden, wobei sich ergeben hat, dass hierbei das Enzym nicht dauernd verändert wird, sondern nach Neutralisation der Säure seine Spaltungskraft wieder zurückerhält.

100 ccm Katalase-Lösung vergiftet, dann mit 100 ccm H_2O_2-Lösung gemischt, und 25 ccm davon titriert. H_2O_2 in der Mischung 0,005 normal.

1/5000 norm. HCl			1/10000 norm. HCl			ohne Zusatz		
Minuten	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$	Minuten	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$	Minuten	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$
0	27,9	—	0	27,9	—	0	27,9	—
70 1/4	25,3	6	15 1/4	25,6	26	5 1/2	19,8	278
136	23,0	6	35 1/2	22,4	27	15	10,5	275
195	20,9	6	66 1/3	18,7	26	25 1/6	5,8	258
1305	3,0	6	185	10,1	24			

1/10000 norm. HCl.
Inkubationszeit: 2 Std.; dann ein kleiner Überschuss von NaOH hinzugefügt;

darauf das H_2O_2			ohne Zusatz		
Min.	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$	Min.	$C_{H_2O_2}$	$k \cdot 10^4$
0	28,7	—	0	28,7	—
5 2/3	23,8	121	5	25,2	120
15 1/6	18,5	113	19 1/2	16,9	121
26 1/6	14,9	86	31 1/3	11,9	127
41 1/2	11,7	70	53	6,5	120

Wie letztere Tabelle zeigt, wird also die Katalase selbst durch zweistündigen Aufenthalt in einer verdünnten Salzsäurelösung nicht verändert. Die Inkubationszeit, d. h. diejenige Zeit, während welcher das Enzym mit der Salzsäure in Berührung ist, hat, wie viele Versuche gezeigt haben, keinerlei Einfluss auf die spätere Wirksamkeit des Enzyms.

Auch durch recht geringe Barytmengen wird die katalytische Fähigkeit der Katalasen vermindert.

Temp. = 10°	$^1/_{500}$ n $Ba(OH)_2$	$^1/_{500}$ n $Ba(OH)_2$	
Katalase aus Fettgewebe	Inkubationszeit:	Inkubationszeit:	Ohne Zusatz
Euler, Hofm. Beitr. 7, 12.	15 Min.	40 Min.	
	$k \cdot 10^3 = 40$	$k \cdot 10^3 = 40$	$k \cdot 10^3 = 60$

In bezug auf die Empfindlichkeit gegen Alkali zeigen Katalasen verschiedener Herkunft erhebliche Unterschiede.

Äusserst schwache Vermehrung der Alkalinität scheint die Spaltungsgeschwindigkeit etwas zu erhöhen. So fand Verf. (l. c.), dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalase aus Boletus scaber verdoppelt, wenn in der Lösung reines Mg $(OH)_2$ aufgeschwemmt wurde.

Immerhin liegt die Optimalwirkung der Katalase sehr nahe am Neutralpunkt, wie sich am deutlichsten aus den Versuchen von Sörensen (Biochem. Z. **21**, 131; 1909) ergibt.

Die Einwirkung von Säuren und Basen auf Katalase beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf Salzbildung dieser Elektrolyte mit dem Enzym.

Auch Bach (Chem. Ber. **38**, 1878; 1905) hat quantitative Versuche mit Katalase angestellt, und findet im allgemeinen die theoretischen Forderungen erfüllt.

Oxydasen.

Stoffe unbekannter Konstitution und Zusammensetzung, welche dem Tier- oder Pflanzenreich entstammen und Oxydationsreaktionen auslösen, wurden, meist ohne eingehendere Prüfung ihrer Wirkungsart als Oxydasen bezeichnet; man stellte allenfalls ihre Wärmeempfindlichkeit fest und zählte sie dann den Enzymen zu. Der Nachweis, dass es sich um katalytische Oxydationsbeschleunigung handelt, ist dabei selten erbracht worden und lässt sich allerdings auch schwer erbringen, besonders wenn man es mit nicht isolierten Bestandteilen eines Organes oder Saftes zu tun hat. Andererseits sind auch zahlreiche andere Enzyme keine Katalysatoren im strengsten Sinne des Wortes, und eine Grenze lässt sich deswegen schwer ziehen. Bei der grossen Verbreitung der Oxydasen in pflanzlichen und tierischen Organismen ist es ja wahrscheinlich, dass sie in allen Lebewesen eine bedeutende Rolle spielen; welches aber diese Rolle ist, d. h. welche Reaktionen die Oxydasen inner-

halb des lebenden Tier- oder Pflanzenkörpers vermitteln, ist einstweilen noch unbekannt. Die Stoffe dieser Klasse, welche wir bisher gewonnen haben, zeigen ein ziemlich beschränktes Wirkungsgebiet.

Aldehydasen.

Medwedew hat das oxydierende Agens von Lebergeweben bezüglich seiner Wirkung auf Salicylaldehyd sehr eingehend untersucht. (Pflüg. Arch. **65**, 249; 1896, ferner **74**, 193; 1899 und **81**, 540; 1900 sowie **103**, 403; 1904.)

Über den Endzustand bezw. das Gleichgewicht ergab sich folgendes: Erster Fall: relativ hohe Konzentration des Salicylaldehyds in neutraler-saurer Lösung. Die Konzentration des Oxydationsproduktes (Salicylsäure) ist umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Konzentration der zu oxydierenden Substanz und annähernd proportional dem Quadrate der Konzentration der Aldehydase.

Zweiter Fall; relativ hohe Konzentration des Salicylaldehyds in neutraler-alkalischer Lösung. Eine und dieselbe Menge der Oxydase gibt am Schluss der Reaktion, d. h. bei vollständigem Erschöpfen der Oxydationsfähigkeit eine und dieselbe Menge Säure, unabhängig von der Konzentration des Aldehyds.

Bezüglich der Geschwindigkeit wurde gefunden: a) Wird der Oxydase-menge m eine überschüssige Menge Aldehyd a zugesetzt, so ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Konzentration des Aldehyds. Durch die Oxydation wird die Leber-Oxydase nach Medwedews Ansicht inaktiviert. Tatsächlich dürfte es sich einfach um den Verbrauch eines aus den Lebergeweben gewonnenen Oxydationsmittels handeln.

b) Die Konzentration des Aldehyds ist geringer als diejenige, welche durch die vorhandene Oxydase oxydiert werden kann; in diesem Fall ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional dem Quadrate der Konzentration des Aldehyds, es wird also $dx : dt = k\,(a - x)^2$, wenn x die Konzentration des zur Zeit t umgesetzten Aldehyds und a dessen Anfangskonzentration bedeuten.

Inwieweit die erwähnten Beziehungen quantitativ reproduzierbar sind, also unabhängig von der nicht kontrollierbaren Beschaffenheit des Leberextraktes, und inwieweit die Deutung der gewonnenen Zahlen die nächstliegende ist, mag dahingestellt bleiben; jedenfalls sind diesbezügliche Zweifel laut geworden (vergl. die Bemerkung von Bach, Chem. Ber. **37**, 3791; 1905), und auch Dony-Hénault und van Duuren sind auf Grund eigener Versuche zu anderen Ergebnissen gelangt (Bull. Acad. roy. Belgique 1907, 577).

Auch Slowtzoffs Befund (H. **31**, 227; 1900), dass „Kartoffellaccase" eine Lösung von Paraphenylendiamin mit einer Geschwindigkeit oxydiert, welche der Quadratwurzel aus der Menge dieser „Laccase" proportional ist, scheint dem Verf. nicht genügend sicher gestellt. Was Slowtzoff untersucht

hat, muss übrigens eine sehr unreine Mischung einer Peroxydase und eines Stoffes gewesen sein, welcher der Medicago-Laccase verwandt ist. Letzteren Bestandteil hat Verf. aus Kartoffeln durch Fällung mit Alkohol gewonnen. Der Stickstoffgehalt der ersten Fällung betrug 2,84 %; nach Auflösung des Präparates, Behandlung mit Tierkohle und wiederholtes Fällen sank der Stickstoffgehalt auf 1,6 %, während hierdurch die Fähigkeit, die Oxydation manganhaltiger Hydrochinonlösungen zu beschleunigen, nicht vermindert wurde.

Was die „Laccasen" betrifft, so geht aus den Untersuchungen von Euler und Bolin hervor (H. **57**, 80; 1908, ferner H. **61**, 1 und 72; 1909), dass die Oxydase aus Rhus vernicifera und succedanea von den Oxydasen aus Medicago sativa u. a., welche nach Bertrand gleichfalls als Laccasen bezeichnet werden, stark verschieden ist. Die Rhus-Präparate sind, wie schon Bertrand zeigte, stark manganhaltig, während die Laccasen vom Medicago-Typus dies nicht sind. Nur die ersteren bläuen Guajakonsäurelösungen direkt und färben Guajakollösungen rot. Sowohl dieser Effekt der Rhus-Laccase wie auch die Übertragung molekularen Sauerstoffes auf Phenole (Hydrochinon, Pyrogallol) wird durch kurzes Erhitzen der Lösung auf 100° aufgehoben, während die Medicago-Laccase durch Erhitzen gar nicht verändert wird.

Für die Rhus-Laccase hat Bertrand (Bull. Soc. Chim. de Paris (3) **17**, 619; 1897) eine angenäherte Proportionalität zwischen Mangangehalt und katalytischer Wirksamkeit festgestellt; die ausserordentliche Säureempfindlichkeit dieses Präparates geht aus folgenden Messungen hervor (Ann. Inst. Pasteur **21**, 673; 1907):

Gemessen wurde die Oxydation des Guajakols zu Tetraguajakochinon. Zu einer 2-prozentigen Guajakollösung wurde wenig Laccase (aus Rhus succedanea) zugefügt (0,1 g pro Liter) und soviel Schwefelsäure, dass die Mischung die in der Tabelle angegebenen Normalitäten besass. Die Resultate geben die nach der Versuchsdauer von 5 Stunden im Kolorimeter beobachteten Intensitäten der durch Tetraguajakochinon verursachten Rotfärbung an.

Normalität der Säure	1. Serie	2. Serie
0	100	100
$\frac{1}{5000}$	100	90,9
$\frac{1}{4000}$	100	75,2
$\frac{1}{2000}$	73,4	60,4
$\frac{1}{1000}$	48,8	60,4
$\frac{1}{500}$	20,3	60,4

Die Oxydasen vom Medicago-Typus beschleunigen in Gegenwart neutraler Mangansalze die Übertragung molekularen Sauerstoffes auf Polyphenole.

Vom zeitlichen Verlauf geben folgende Versuche ein Bild:

In einem Glasgefäss, in welchem die Luft durch reinen Sauerstoff verdrängt worden war, wurden 50 ccm von Lösungen mechanisch geschüttelt, welche in Bezug auf Hydrochinon 0,2 normal, in Bezug auf Manganacetat 0,001 äquiv.-normal waren. Ausserdem enthielten die Lösungen abgewogene

Mengen von Medicago-Oxydase. Die unter dem Einfluss von Mangan und Oxydase entstehende Oxydation des Hydrochinons zu Chinon bezw. Chinhydron wurde durch die Abnahme des Sauerstoffvolumens gemessen.

0,2 g Oxydase in 50 ccm		0,1 g Oxydase in 50 ccm	
Minuten	abs. ccm O_2	Minuten	abs. ccm O_2
5	1,3	5	1,0
10	2,3	10	1,7
15	3,0	15	2,2
20	4,1	20	2,5
30	5,9	30	3,1

Es hat sich gezeigt, dass die Medicago-Oxydase ein Gemisch von Calciumsalzen organischer, ein- und mehrbasischer Oxysäuren ist, unter welchen sich Glykolsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure und Mesoxalsäure befinden. Die katalytische Wirkung dieser reinen Salze entspricht durchaus derjenigen der Medicago-Oxydase, wie die folgenden Zahlen zeigen, welche unter den gleichen Bedingungen erhalten worden sind, wie die obigen.

0,2 g Calciummalat in 50 ccm		0,1 g Calciumglykolat 0,05 g Calciummalat 0,05 g Calciummesoxalat } in 50 ccm	
Minuten	abs. ccm O_2	Minuten	abs. ccm O_2
5	1,8	5	2,3
10	2,9	10	3,4
20	4,5	15	4,1
30	5,7	20	4,8
		30	5,9

Da bekanntlich die Oxydation von Polyphenolen an sich und noch mehr in Gegenwart von Mangansalzen schon durch geringe Mengen von Alkalien stark beschleunigt wird, so musste besonders auf die Neutralität der Oxydase und der Calciumsalze geachtet werden. Sie waren bei der hier referierten Untersuchung durchaus neutral.

Da die Salze von aliphatischen Oxysäuren alle mehr oder weniger wirksam zu sein scheinen, so dürfte also diese Gruppe von Oxydasen im Pflanzenreich sehr häufig vorkommen.

Peroxydasen.

Vermutlich weiter verbreitet und deswegen auch von allgemeinerer Wirksamkeit sind diejenigen Stoffe des Tier- und Pflanzenkörpers, welche Peroxyde einschliesslich Hydroperoxyd aktivieren, d. h. den Peroxydsauerstoff derselben auf andere Substanzen übertragen; man bezeichnet sie als Peroxydasen.

Welche Veränderungen die Peroxydasen selbst erleiden, während sie den Sauerstoff der Peroxyde auf Stoffe wie α-Guajakonsäure übertragen, ist nicht bekannt, und es sind mehrfach Zweifel darüber geäussert worden, ob

die Peroxydasen wirklich als Katalysatoren und als Enzyme anzusehen sind. Besonders letzterer Begriff ist so schwankend, dass sich vorläufig, wo wir so wenig Exaktes über die chemische Natur der Peroxydasen wissen, eine diesbezügliche Diskussion wohl nicht lohnt. Wir gehen also gleich auf die zahlenmässigen Beziehungen über, durch welche ihre Wirkung charakterisiert wird; wir verdanken dieselben Chodat und Bach und ihren Schülern.

Die Versuche, welche wir zuerst mitteilen wollen (Chem. Ber. **37**, 1342; 1904), sind so ausgeführt, dass bestimmte Mengen von Peroxydase (aus Meerrettichwurzeln) Hydroperoxyd und Pyrogallol in wässeriger Lösung zusammengebracht wurden, worauf das entstandene Purpurogallin nach 24 Stunden auf tarierten Filtern gesammelt, mit 100 ccm Wasser ausgewaschen, bei 110° bis Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen wurde. Pyrogallol wird weder von Peroxydase noch von Hydroperoxyd allein merklich angegriffen.

3 Versuchsreihen wurden angestellt:

A. Mit wechselnden Peroxydasemengen bei konstanten Hydroperoxyd- und Pyrogallolmengen.

B. Mit wechselnden Hydroperoxydmengen bei konstanten Peroxydase- und Pyrogallolmengen.

C. Mit wechselnden Pyrogallolmengen bei konstanten Peroxydase- und Hydroperoxydmengen.

Temp.: 15—17°. Volum der Mischung: 35 ccm.

A.

Angewandtes H_2O_2 : 0,10 g. Angewandtes Pyrogallol : 1 g.

Angew. Peroxydase in g:	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
Entstand. Purpurogallin in g:	0,021	0,042	0,066	0,083	0,102	0,123	0,145	0,166	0,167	0,162

B.

Angew. Peroxydase: 0,10 g. Angewandtes Pyrogallol : 1 g.

Angew. Hydroperoxyd in g:	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
Entstand. Purpurogallin in g:	0,205	0,42	0,60	0,78	0,99	0,121	0,142	0,168	0,168	0,165

Die Versuche A zeigen mit auffallender Schärfe, dass bei steigenden Peroxydasemengen und konstanten (überschüssigen) Hydroperoxydmengen die Ausbeuten an Purpurogallin den angewandten Peroxydasemengen genau proportional sind. Bei wechselnden Hydroperoxydmengen und konstanten (überschüssigen) Peroxydasemengen ist dagegen, wie die Versuche B beweisen, der Umsatz den ersteren proportional.

Ein Überschuss an Peroxydase oder an Hydroperoxyd ist auf die Oxydationsleistung des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd ohne jeden Einfluss. Daraus ziehen Bach und Chodat den Schluss, dass Peroxydase und Hydroperoxyd stets in konstanten Verhältnissen an der Reaktion beteiligt sind. Sie gelangen so zu der gleichen Annahme, welche bereits Kastle und Loeven-

hart in einer sehr bemerkenswerten Arbeit über Oxydasen ausgesprochen hatten (Amer. Chem. J. **26**, 593; 1901), dass die Peroxydase mit dem Hydroperoxyd eine definierte Verbindung bildet, welche kräftigere oxydierende Eigenschaften besitzt als das Hydroperoxyd. Das Ergebnis der beiden genannten Forscher, dass ein Überschuss von Hydroperoxyd auf die Grösse des Umsatzes keinen Einfluss ausübt, weist auch darauf hin, dass die Peroxydase im Verlauf des Oxydationsprozesses verbraucht wird.

C.

Angew. Peroxydase: 0,10 g.	Angew. Hydroperoxyd: 0,10 g.			
Angew. Pyrogallol in g:	1,5	2	3	4
Entstandenes Purpurogallin in g:	0,205	0,203	0,208	0,202

Aus den Versuchen C ergibt sich, dass die Konzentration des Pyrogallols auf die Grösse des Umsatzes ohne Einfluss ist.

Da sich die Bildung des Purpurogallins und die oben beschriebene Arbeitsweise nicht dazu eignete, das Zeitgesetz der Peroxydasewirkung festzustellen, wählten Bach und Chodat (Chem. Ber. **37**, 2434; 1904) hierzu eine andere Reaktion, nämlich die Oxydation des Jodwasserstoffes.

5 ccm einer Lösung, welche in Bezug auf Essigsäure und auf Hydroperoxyd $^1/_{2000}$ normal war, wurde zu 45 ccm einer Lösung zugesetzt, welche $^1/_{2000}$ Äquivalent Jodkalium und wechselnde Mengen Peroxydase enthielt. Das nach einer gewissen Zeit ausgeschiedene Jod wurde mit Thiosulfat titriert.

$\frac{1{,}25}{100\,000}$ Äquiv.[1]) Peroxydase.

Minuten	1	2	4	6	8	10	12	20
ccm Thiosulfat:	1,3	2,4	4,4	6,1	7,1	7,9	8,1	8,4

Parallelversuch ohne Peroxydase.

Minuten	2	4	6	8	10	12	20
ccm Thiosulfat:	0,25	0,45	0,6	0,8	0,9	1,1	1,6

$2{,}5 \cdot 10^5$ Äquiv. Peroxydase

Minuten:	1	2	4	6	8	10	20
ccm Thiosulfat:	2,4	4,7	8,4	10,2	11,7	11,8	12,3

$5 \cdot 10^5$ Äquiv. Peroxydase

Minuten:	1	2	4	6	8	10	20
ccm Thiosulfat:	4,9	8,9	14,0	14,7	15,0	13,1	15,4

$10 \cdot 10^5$ Äquiv. Peroxydase

Minuten:	1	2	4	6	8	10	20
ccm Thiosulfat:	10,1	15,7	17,0	17,1	17,2	17,2	17,4

[1]) Das Peroxydasepräparat war das gleiche wie bei den obigen Versuchen; es aktivierte genau seinen Gewichtsteil Hydroperoxyd; nach Bachs und Chodats Ausdrucksweise hat dieses Peroxydasepräparat das Aktivierungsvermögen 1.

$15 \cdot 10^5$ Äquiv. Peroxydase

Minuten:	1	2	4	6	8	10	20
ccm Thiosulfat:	15,0	18,6	19,1	19,1	19,2	19,2	19,4

Zunächst sieht man, dass die Peroxydase bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure ebenso wie bei der Oxydation des Pyrogallols schliesslich ausser Wirksamkeit gesetzt wird, da die Reaktion stets nach einiger Zeit in einen Zustand kommt, in welchem sie genau wie ohne Peroxydasezusatz verläuft; die Wirksamkeit der Peroxydase nimmt um so schneller ab, je grösser die Peroxydkonzentration ist. Die mit verschiedenen Peroxydasekonzentrationen erhaltenen Ergebnisse sind daher nur dann vergleichbar, wenn man Reaktionsphasen wählt, bei welchen die Peroxydase noch nahezu ihre volle Wirksamkeit ausübt.

Dies ist am Ende der ersten Minute noch der Fall. Nach dieser Zeit ist die Grösse des Umsatzes den Peroxydasemengen innerhalb der Versuchsfehler genau proportional:

Konz. der Peroxydase $\times 10^{-5}$:	2,5	5	10	15
Nach 1 Minute umges. Menge in ccm:	2,4	4,9	10,1	15,0

Vergleicht man die Endzustände, welche im System Jodwasserstoff-Peroxydase-Hydroperoxyd eintreten, so ergibt sich, dass das auftretende Reaktionsprodukt (Jod) nicht, wie bei der Oxydation des Pyrogallols den Peroxydasemengen direkt proportional ist, sondern in geringerem Grad wächst als letztere. Bemerkenswert ist, dass das Aktivierungsvermögen der Peroxydase (also das durch eine gewisse Gewichtsmenge a eines Peroxydasepräparates aktivierte Hydroperoxyd x, somit der Quotient $\frac{x}{a}$) bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch Hydroperoxyd beträchtlich grösser ist, als bei der Oxydation des Pyrogallols.

Diese Versuche mit Jodwasserstoffsäure hat dann Bach (Chem. Ber. **37**, 3785; 1904) ergänzt. Er bestimmte die Jodausscheidung, welche während 10 Minuten bei 22° in verschieden konzentrierten Mischungen von JH, H_2O_2 und Meerrettigperoxydase erfolgten; die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Vergrösserung des Umsatzes in ccm 0,01 n. Thiosulfat.

	Peroxydase	I (12,5 HJ)	II (25 HJ)	III (37,5 HJ)	IV (50 HJ)	V (75 HJ)	VI (100 HJ)
A	1,25	3,1	4,4	5,0	5,4	5,3	5,4
B	2,5	5,1	7,1	7,9	8,5	8,6	8,5
C	5,0	7,0	9,5	11,3	13,2	13,6	13,6
D	10,0	9,3	12,9	15,7	17,9	21,4	25,1
E	15,0	10,9	15,9	18,5	21,6	26,0	29,3
F	21,0	10,7	17,6	21,4	25,5	29,1	33,6
G	25,0	10,8	17,8	24,0	28,4	32,6	37,1
Nullreihe		0,7	1,4	2,0	2,7	4,1	5,4

Die Vergrösserung des Umsatzes in der angegebenen Zeit wächst sowohl mit der Konzentration der Peroxydase wie mit derjenigen der Jodwasserstoffsäure; sie erreicht für jede Peroxydase- und Jodwasserstoffsäure-Konzentration eine gewisse Grenze, und bleibt dann stehen, so dass man schliessen darf, dass Peroxydase, Jodwasserstoffsäure und Hydroperoxyd miteinander in bestimmten Verhältnissen reagieren.

Man ersieht leicht aus der vorstehenden Tabelle, dass das Produkt aus den Konzentrationen (innerhalb gewisser Grenzen) eine Konstante ist, so ist z. B. $D \times I = C \times II$ usw.

Vergleicht man schliesslich die Jodwasserstoffsäure-Konzentrationen, welche verschiedenen Vergrösserungen des Umsatzes entsprechen, so ergibt sich, dass diese Vergrösserungen den Quadratwurzeln aus den Jodwasserstoffsäurekonzentrationen fast genau proportional sind, wie durch folgende Zusammenstellung veranschaulicht wird.

	I	II	III	IV	V	VI
Reihe D	9,2	12,9	15,7	17,9	21,4	25,1
Berechnet	9,2	13,0	15,9	18,6	22,4	25,9
Reihe E	10,9	15,9	18,5	21,6	26,1	29,3
Berechnet	10,9	15,3	18,8	21,8	26,5	39,7

Indessen hat Bach die Geschwindigkeit mit einem anderen Präparat nicht wieder erhalten; dagegen ergab sich eine neue, früher nicht gefundene Beziehung:

Vergrösserungen des Umsatzes in ccm 0,01 Thiosulfat.

	Peroxydase	I (12,5 HJ)	II (25 HJ)	III (37,5 HJ)	IV (50 HJ)	V (75 HJ)	VI (100 HJ
A	1,25	1,2	2,4	3,3	4,2	4,2	4,1
B	2,50	2,2	4,2	6,1	8,1	8,3	8,2
C	5,0	3,6	6,0	9,4	12,1	15,2	15,8
D	10,0	4,4	8,3	12,2	14,6	20,7	25,9
E	15,0	5,0	9,6	13,8	18,5	27,4	36,6
F	20,0	5,0	10,1	15,1	20,1	30,2	41,0
G	25,0	5,1	10,2	15,6	20,4	30,0	40,8
Nullreihe		0,7	1,6	2,2	2,9	4,1	5,6

Wie die Versuchsreihen F und G zeigen, ist nach Erreichung des Peroxydase-Maximums die Vergrösserung des Umsatzes den Jodwasserstoff-Konzentrationen genau direkt proportional.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass für die vollständige Ausnutzung der Peroxydase eine bestimmte Acidität der Reaktionsflüssigkeit (Konzentration der Wasserstoffionen) erforderlich ist, wobei die Natur des Anions der Säure keine Rolle spielt.

Tyrosinase.

Im Anschlusse an eine Untersuchung über melanotische Pigmente und enzymatische Melaninbildung[1]) haben O. v. Fürth und E. Jerusalem (Hofm. Beitr. **10**, 131; 1907) die Wirkungsweise der Tyrosinase studiert. Die recht komplizierten Verhältnisse, welche diese Autoren gefunden haben, veranlassten dann Bach (Chem. Ber. **41**, 216 und 221; 1907), welcher auch die Tyrosinase als ein Gemisch einer Oxygenase und einer Peroxydase betrachtet, die Reaktionsbedingungen dieses Enzyms festzustellen.

Die gebildeten Melaninmengen wurden in folgender Weise bestimmt: Von den auf das 10 fache mit destilliertem Wasser verdünnten Säften werden je 10 ccm mit 10 ccm Tyrosinlösung (0,05% Tyrosin und 0,04% Natriumkarbonat enthaltend) und 30 ccm Wasser zusammengebracht; nach Verlauf von 24 Stunden wurden die Proben mit je 1 ccm 10%iger Schwefelsäure angesäuert und mit 0,002 normaler Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert.

Die Tyrosinase wurde aus Russula delica gewonnen.

1. Abhängigkeit der Melaninbildung von der Tyrosinasekonzentration.

In eine Reihe von 8 Bechergläsern wurden je 10 ccm Tyrosinlösung, steigende Mengen Enzymlösung und Wasser bis auf 50 ccm gegeben.

Verbrauchte Permanganatlösung.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Zugesetzte Enzymmengen in ccm:	0,5	1,0	1,5	2,0	5,0	10,0	15,0	20,0
A. 24 Stunden:	10,8	14,2	17,3	19,8	25,8	30,4	33,6	35,8
B. 48 Stunden:	13,2	16,0	17,8	20,4	25,6	31,2	34,4	35,4

Aus diesen Versuchen geht hervor: 1. dass die Menge des Reaktionsproduktes mit der Enzymmenge, wenn auch langsamer als letztere steigt, und 2. dass die Reaktion um so schneller zu einem Stillstand kommt, je grösser die Enzymkonzentration ist. Die Tyrosinase verhält sich in dieser Hinsicht genau wie die Meerrettichperoxydase (vergl. S. 163).

2. Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration: Drei Erlenmeyerkolben von 75 ccm Inhalt wurden mit je 100 ccm Tyrosinlösung, steigenden Enzymmengen und Wasser bis auf 500 ccm beschickt.

Verbrauchte Permanganatlösung.

Rel. Enzymmenge in 500 ccm Lösung		10 ccm	20 ccm	30 ccm
		ccm	ccm	ccm
Zeit in Stunden:	1	0,0	1,4	2,8
	2	0,0	3,9	5,7
	3	1,6	5,8	8,8
	4	2,7	7,8	11,1
	6	5,5	11,1	16,1
	9	9,4	16,3	20,8
	14	15,9	19,0	22,3
	24	16,0	19,9	22,8

[1]) Einen Anfang, den bis jetzt dunkeln Chemismus der Tyrosinasewirkung aufzuklären haben in einer bemerkenswerten Arbeit Abderhalden und Guggenheim (H. **54**, 331; 1907) gemacht.

Eine Reaktionskonstante lässt sich kaum mit Sicherheit berechnen, da die Lage des Endwertes zweifelhaft ist. Vergleicht man aber die Zeiten gleichen Umsatzes, so zeigt sich ausgeprägt eine umgekehrte Proportionalität zwischen Enzym und Reaktionszeit: das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionszeit ist also konstant. Dabei ist nur von den Anfangs- und Endstadien der Reaktion abzusehen. Das erklärt sich so, dass bei niederen Enzymkonzentrationen die Reaktion langsamer als bei den höheren eintritt, bei letzteren das Enzym rascher inaktiviert wird.

Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration:

3 Kolben mit je 25 ccm, 50 ccm und 75 ccm Tyrosinlösung + 30 ccm Enzymlösung auf 500 ccm verdünnt.

		Verbrauchte Permanganatlösung.		
Tyrosinlösung	ccm	25	50	75
Nach Stunden	1	1,0	1,9	3,0
	3	3,1	6,3	9,2
	5	4,8	9,4	13,9
	8	7,0	12,4	14,7
	24	8,4	12,6	16,2

Bei gleicher Enzymkonzentration sind — von den Endstadien abgesehen — die pro Zeiteinheit gebildeten Melaninmengen den Tyrosinmengen proportional.

Die Tyrosinase fügt sich also auffallend gut dem Massenwirkungsgesetz.

Kap. V.

Einfluss der Temperatur und Strahlung auf enzymatische Reaktionen.

Die Temperatur beeinflusst chemische Systeme auf zweierlei Art:

Sie ist zunächst einer der Faktoren, welche die Lage des Gleichgewichtes zwischen den Komponenten einer umkehrbaren Reaktion bestimmen. Wie stark sich das Gleichgewicht in jedem Fall mit dem wechselnden Wärmegrad verändert, steht bekanntlich mit der Wärmetönung der betr. Reaktion in engstem Zusammenhang. Bezeichnet man die Gleichgewichtskonstante einer Reaktion, wie früher, mit K, bedeutet ferner U die totale, im Kalorimeter gemessene Wärmetönung, T die,absolute Temperatur und R die Gaskonstante, so lautet der für die Thermochemie fundamentale van't Hoffsche Satz:

$$\frac{d \ln K}{dT} = - \frac{U}{RT^2} \quad \ldots \ldots \ldots \quad (22)$$

Ist also die Wärmetönung einer Reaktion klein — und dies ist bei den meisten enzymatischen Prozessen der Fall, so ist das Gleichgewicht von der Temperatur nur wenig abhängig.

Sehr viel stärker ändert sich mit der Temperatur die Geschwindigkeit, womit sich ein System seinem Gleichgewichts- bezw. Endzustande nähert. In den meisten Fällen wird durch einen Temperaturzuwachs von 10^0 die Geschwindigkeit verdoppelt oder verdreifacht, eine Erscheinung, auf welche van't Hoff zuerst die Aufmerksamkeit gelenkt hat. Indessen kommen auch bei nicht enzymatischen Reaktionen noch höhere Temperaturkoeffizienten vor. Aus dem reichen experimentellen Material erwähnen wir ein paar biologisch interessante Reaktionen:

Autor	Reaktion	Temperatur-intervall	$\frac{k_{t+10}}{k_t}$	μ
Price, Svenska Vet. Akad. Förh. 1899	Äthylacetat + H_2O	28—50°	2,4	17 390
Euler, Chem. Ber. 38	Formaldehyd + Na OH	50—85°	3,6	24 900
Spohr, Zeitschr. physik. Chem. 2	Inversion d. Rohrzuckers	25—55°	3,6	25 600

Die Quotienten $\frac{k_{t+10}}{k_t}$ (Spalte 4), gelten nur für ein gewisses Temperaturintervall. Der Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit pro Grad nimmt ab, wenn die Temperatur steigt. Dagegen gilt die Konstante μ (Spalte 5) in einem sehr grossen Bereiche der Wärmeskala. Diese Konstante ergibt sich aus der von Arrhenius theoretisch begründeten, allgemein gültigen Formel:

$$k_2 = k_1 e^{\frac{\mu}{R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1}\right)}, \quad \ldots \ldots \ldots \quad (23)$$

sie ist also ein exakter Ausdruck für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur. In der Formel bedeuten k_1 und k_2 die Reaktionskonstanten bei den absoluten Temperaturen T_1 und T_2; ferner ist R die Gaskonstante und e die Basis der natürlichen Logarithmen.

Einen etwa gleich starken Einfluss wie auf die Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen übt die Temperatur ausserdem noch auf den Dampfdruck von Flüssigkeiten und auf gewisse Dissoziationsgleichgewichte aus. Letztere Übereinstimmung wird erklärlich, wenn man die Annahme macht, dass auch die organischen Reaktionen durch Ionen vermittelt werden. Die Konstante μ gibt die Umwandlungswärme an, welche den Übergang der beteiligten Moleküle aus dem „normalen“ in den „aktiven“ Zustand begleitet, und sie entspricht somit der Summe der Dissoziationswärme der beteiligten Stoffe. Betrachten wir z. B. die Inversion des Rohrzuckers, so wird μ die Summe der Dissoziationswärme $U_{1\ diss.}$ des Wassers und der Dissoziationswärme $U_{2\ diss.}$ des Rohrzuckers (dieser als Base gemessen). Die Dissoziationswärme des Wassers ist 13450 Cal; die Dissoziationswärme $U_{2\ diss.}$ ist noch nicht bekannt, aber man weiss, dass so äusserst schwache Elektrolyte, wie Rohrzucker es sein muss, im allgemeinen ungefähr gleich grosse Dissoziationswärmen besitzen, wie das Wasser. Unter dieser Annahme für $U_{2\ diss.}$ wird $\mu = 26900$, während die Berechnung der experimentellen Resultate nach Arrhenius' Formel den Wert 25600 ergibt (Euler, Z. physik. Chem. **47**, 353; 1904). Hier ist von dem Einfluss der Temperatur auf die Verbindung Substrat-Katalysator (also auf das Chlorhydrat bezw. Sulfat usw. des Rohrzuckers) scheinbar abgesehen. Indessen wird der genannte Einfluss, da die Dissoziation der starken Säuren und Salze sich mit der Temperatur relativ wenig ändert, in erster Linie durch die Dissoziationswärme des Rohrzuckers und des Wassers bestimmt.

Auf die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen hat die Temperatur einen doppelten Einfluss, nämlich den eben besprochenen, welcher für alle chemischen Reaktionen charakteristisch ist, und ausserdem eine Einwirkung auf die Aktivität des katalysierenden Enzyms, welches mit steigender Temperatur immer schneller zerstört bezw. dauernd inaktiviert wird.

Die Vorgänge, welche sich aus diesen beiden Wirkungen ergeben, hat

Tammann zuerst theoretisch und experimentell behandelt (Z. physik. Chem. **18**, 436; 1895).

Die einfachste Annahme ist die, dass das Enzym durch eine monomolekulare Reaktion in wässeriger Lösung inaktiviert wird, unabhängig von dem, was sich sonst in der Lösung befindet. Wenn also E die anfängliche Enzymkonzentration bedeutet, y die Enzymkonzentration zur Zeit t, so wird man setzen:

$$\frac{dy}{dt} = k_E\,(E - y)$$

und somit ist

$$E - y = E \cdot e^{-k_E t}, \qquad (24)$$

wo e die Basis der natürlichen Logarithmen bezeichnet, und

$$k_E = \frac{1}{t} \ln \frac{E}{E-y} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (25).$$

Bedeutet ferner, wie gewöhnlich, a die Konzentration des ursprünglich vorhandenen Substrates, welches nach einer Gleichung 1. Ordnung gespalten wird, so ist

$$v = \frac{dx}{dt} = k\,(a - x)\,(E - y) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (26),$$

d. h. die Geschwindigkeit, mit der sich die Reaktion zur Zeit t vollzieht, muss gleich sein dem Produkt der noch vorhandenen Mengen des Enzymes und des sich umwandelnden Stoffes.

Substituiert man in letzterer Gleichung den Wert E—y aus (24), so gelangt man nach Tammann zur Integralgleichung:

$$\ln \frac{a-x}{a} = -\frac{k}{k_E} \cdot E\,(1 - e^{-k_E t}) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (27).$$

Aus Gleichung (27) hat Tammann das „falsche Gleichgewicht", also den enzymatischen Endzustand der Reaktion berechnet und diesen mit dem am System Emulsin-Salicin experimentell bestimmten verglichen. Folgende Tabellen sind ein Auszug aus den von Tammann gegebenen.

Zu einer vorgewärmten Lösung von Salicin wurden verschiedene Emulsinmengen gesetzt, so dass 100 ccm Mischung 3,007 g Salicin und die tabellierten Mengen von Emulsin enthielten.

	Gespaltene Salicinmengen in %			
Emulsin in g	72 Stunden	104 Stunden	148 Stunden	
0,250	63,4	65,1	65,4	Temp. = 65°
0,125	48,3	50,2	50,4	
0,0312	16,4	17,0	16,8	
Emulsin in g	45 Stunden	86 Stunden	166 Stunden	
0,250	(101,2)	99,2	—	Temp. = 45°
0,125	97,5	97,5	(100,2)	
0,0156	59,3	65,7	67,6	

Emulsin in g	45 Stunden	93 Stunden	334 Stunden	
0,250	96,5	98,0	100,2	Temp. = 26°
0,125	96,5	97,5	99,6	
0,0156	85,8	92,1	98,0	

Wie man sieht, kommt die Reaktion um so früher zum Stillstand, je höher die Temperatur ist, also je schneller das Enzym inaktiviert wird.

Besonders sei hier darauf aufmerksam gemacht, dass wohl zu unterscheiden ist zwischen der dauernden, nicht reversibeln Inaktivierung, welche jedes Enzym, und zwar besonders bei höherer Temperatur, erleidet, und der durch die Reaktionsprodukte veranlassten Inaktivierung, welche durch Entfernung der Reaktionsprodukte rückgängig wird. In letzteren Fällen, wo das katalysierende Enzym durch Reaktionsprodukte beschlagnahmt wird, hemmt sich die Reaktion selbst, indem sie also ihren eigenen Katalysator verbraucht. Eine solche katalytische Verzögerung hat Ostwald (Lehrb. II (2) 271) behandelt.

Aus der für diesen Fall geltenden Differentialgleichung

$$\frac{dx}{dt} = (k_1 - k_2\, x)\,(A - x)$$

erhält man durch Integration:

$$\frac{1}{k_1 - A\,k_2} \ln \frac{A\,k_2\,(k_1 - k_2\,x)}{k_1\,(A\,k_2 - k_2\,x)}. \qquad (28)$$

Wie Ostwald bemerkt, darf $k_2\,x$ zu Anfang der Reaktion nicht grösser sein als k_1, da sonst die Reaktion überhaupt nicht eintritt. Sehr wichtig ist der Umstand, dass die Reaktionsgeschwindigkeit $= 0$ wird, wenn $k_1 - k_2\,x = 0$, also wenn $k_1 = k_2\,x$. Die Reaktion gelangt also hier zu einem „falschen Gleichgewicht“ bezw. Endzustand.

Der Einfluss der Temperatur auf eine enzymatische Reaktion ist also ein zweifacher: 1. Die Reaktionsbeschleunigung und 2. die Enzyminaktivierung. Es steigt mit der Temperatur also sowohl k als k_E, und handelt es sich darum, den Einfluss der Temperatur auf eine enzymatische Reaktion zu bestimmen, so sollte, wie es Tammann getan hat, der Temperaturkoeffizient sowohl für k als für k_E angegeben werden. Am besten wird die Temperaturfunktion der beiden Werte durch die Arrheniussche Formel ausgedrückt.

Wegen der Abhängigkeit der Stabilität des Katalysators von der Temperatur erhält die Temperaturkurve enzymatischer Reaktionen ein anderes Aussehen als diejenige der meisten anderen chemischen Prozesse. Es tritt nämlich ein Optimumpunkt auf; der Temperaturkoeffizient wird also bei einem gewissen Wärmegrad $= 0$, d. h. der Geschwindigkeitszuwachs der Substratspaltung wird durch den Geschwindigkeitszuwachs der Enzymzerstörung gerade kompensiert; bei weiterer Wärmezufuhr sinkt dann die Reaktionsgeschwindigkeit.

Der Zerfall der Enzyme erfolgt, wie S. 169 erwähnt, nach der Formel für monomolekulare Reaktionen[1]). Er wird am besten in der Weise festgestellt, dass das Enzym, welches sich eine gewisse Zeit bei der zu untersuchenden Temperatur in wässeriger Lösung befunden hat, wenn möglich bei tieferer Temperatur mit dem Substrat vermischt wird, worauf man aus der Anfangsgeschwindigkeit die Konstante k_E berechnet. Aus den für verschiedene Temperaturen ermittelten Werten k_E ergibt sich dann die Konstante μ der S. 168 angegebenen Arrheniusschen Temperaturformel

$$k_2 = k_1 e^{\frac{\mu}{R} \cdot \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1}}$$

Freiwillige Zersetzung von:	μ	
Emulsin in 0,5%iger Lösung	45000	Tammann
Lab in 2%iger Lösung[2])	90000	Madsen und Walbum[4])
Trypsin in 2%iger Lösung	62034	Madsen und Walbum[4])
Pepsin in 2%iger Lösung[3])	75600	Madsen und Walbum[4])
Hefeninvertase	72000	Euler und af Ugglas
Trockenes Emulsin	26300	Tammann

Ferner sind zu erwähnen die Messungen von Nicloux an Lipase (Soc. Biol. **56**), nach welchen μ = ca. 26000 ist.

Senter (Z. physik. Chem. **44**) gibt an, dass die Zerstörung der Blutkatalase bei 55° ungefähr 6—7 mal schneller geht als bei 45; μ wird ungefähr 50000.

Besonders hervorzuheben sind die hohen Werte von μ, welche sich hier ergeben im Vergleich zu den entsprechenden Konstanten anderer Reaktionen, wie z. B. der S. 167 angeführten. Das an trockenem Emulsin gewonnene Resultat zeigt die geringere Wärmeempfindlichkeit trockener Enzyme im Vergleich zu

---

[1]) Die mannigfachen Störungen, welchen diese Reaktionen ausgesetzt sind, verursachen oft grosse Abweichungen von der einfachen Reaktionsformel und grosse Versuchsfehler; doch dürfte man Senter nicht beipflichten, wenn er die Gültigkeit der genannten Formel in Abrede stellt.

[2]) Durch blosses, wenige Minuten dauerndes Schütteln werden Lablösungen schon bei Zimmertemperatur schnell inaktiviert. Diesen Vorgang haben neuerdings Signe und Sigval Schmidt-Nielsen eingehend studiert. Der Temperaturkoeffizient dieser „Schüttel-Inaktivierung" ist ziemlich klein; die genannten Verff. haben die Arrheniussche Konstante μ zu etwa 7000 bestimmt. Noch kleiner ist der Temperaturkoeffizient der Lichtinaktivierung; bei derselben beträgt μ nur etwa 1500.

Vermutlich handelt es sich bei der „Schüttel-Inaktivierung" bezw. Denaturierung und Häutchenbildung teils um eine Oberflächenwirkung, teils um den Einfluss des Luftsauerstoffs; in zahlreichen kolloiden Lösungen tritt beim Schütteln an der Luft Ausflockung ein.

[3]) Nach Shaklee (Zentralbl. f. Physiol. **23**, 4; 1909) verliert Pepsin bei 37° seine Wirksamkeit nach der Formel für bimolekulare Reaktionen: $k = \frac{1}{at} \frac{x}{(a-x)}$, wo a die ursprüngliche Pepsinmenge, x die zur Zeit t umgesetzte (zerstörte) Pepsinmenge bedeutet. Nach 12 Tagen sollen 86% des Enzyms zerstört sein.

[4]) Berechnet von Arrhenius (Immunochemie S. 64).

gelösten. Qualitativ sind ähnliche Ergebnisse vielfach an anderen Enzymen erhalten worden (Salkowski u. a.). Die numerischen Werte, welche unter diesen Umständen für μ gefunden werden, sind, wie leicht einzusehen, in höchstem Grad von der Vorbehandlung und besonders der Feuchtigkeit der Enzympräparate abhängig, und haben nur dann eine reelle Bedeutung, wenn die Zusammensetzung der Präparate einigermassen definiert ist.

Auch die Zerfallsgeschwindigkeit der gelösten Enzyme und ihr Temperaturkoeffizient ist in hohem Grad von gleichzeitig in der Lösung vorhandenen Stoffen abhängig. Geringe Mengen von Säuren oder Basen beeinträchtigen die Stabilität oft enorm; so beschleunigen z. B. Basen in hohem Grad die Zerstörung des Labs und des Trypsins (Immunochemie S. 57).

Salze begünstigen manchmal die Stabilität der Enzyme erheblich; so liegt nach Vernon (Journ. of Physiol. **27**) das Optimum der Pankreasdiastase in einer Stärkelösung, welche 0,2% Kochsalz enthält bei 50°, während in reiner wässeriger Stärkelösung die Optimumtemperatur bei 35° gefunden wurde.

Abgesehen hiervon ist es bekannt, dass viele neutrale Stoffe, speziell Eiweisskörper[1]) und andere Kolloide (Journ. of Physiol. **31**), besonders aber die spezifischen Substrate die Stabilität der Enzyme bedeutend erhöhen. Auf letztere Tatsache haben bereits O'Sullivan und Tompson (l. c.) hingewiesen. Biernacki (Z. f. Biol. **28**) und Vernon (Journ. of Physiol. **27**, **28** u. **31**) haben dasselbe für Trypsin konstatiert[2]).

In verdünnter Lösung soll Invertase haltbarer sein als in konzentrierter (Effront, Die Diastasen, S. 62).

Der Temperaturkoeffizient der enzymatischen Reaktionen selbst, also die Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten k mit der Temperatur ist von der gleichen Grössenordnung wie derjenige anderer chemischer Prozesse. Man wird stets versuchen, den Temperaturkoeffizienten in einem Bereich der Wärmeskala zu messen, in welchem die Zerstörung des Enzyms möglichst wenig in Betracht kommt. Bei den meisten der vorliegenden Messungen ist der Abstand vom Optimum so gering, dass die Konstanten μ durch die Enzymzerstörung beeinflusst sind, und deswegen zu klein ausfallen. Auch die Beobachtungsfehler sind meist selbst in Arbeiten zuverlässiger Experimentatoren sehr gross, wie folgende Beispiele zeigen.

---

1) Nicht spezifisch spaltbare Eiweisskörper wirken hierbei oft als „Puffer".

2) In diesem Zusammenhang wären noch Beobachtungen von W. Cramer und Bearn (Journ. of Physiol. **34**; 1906) zu erwähnen, nach welchen wirksames Pepsin gehemmt wird durch Zusatz von solchen Pepsinlösungen, welche bei 60° inaktiviert wurden; wogegen bei 100° inaktivierte Präparate kaum oder gar nicht hemmen.

Auld (J. Chem. Soc. **93**, 1275; 1908) Messungen an Amygdalin, Emulsin.

$k_{t+10} : k_t$

$k_{25} : k_{15} = 2{,}37$	$k_{45} : k_{35} = 1{,}37$
$k_{30} : k_{20} = 1{,}81$	$k_{50} : k_{40} = 1{,}71$
$k_{35} : k_{25} = 2{,}14$	$k_{55} : k_{45} = 1{,}04$
$k_{40} : k_{30} = 1{,}68$	

Von Kastle und Loevenhart (Am. Chem. J. **24**, 501, 1900) wurden Röhren, enthaltend 4 ccm Wasser, 0,1 ccm Toluol und 1 ccm eines 10%igen Leber- oder Pankreasextraktes 5 Minuten lang im Bade bei bezw. 40°, 30°, 20°, 10°, 0° und — 10° gelassen, um diese Temperatur anzunehmen. Dann wurden 0,23 ccm Äthylbutyrat zugesetzt, und die Lösungen nach 30 Minuten titriert.

	Prozent hydrolysiert	
Temp.	durch Leberextrakt	durch Pankreasextrakt
40°	11,29 (?)	2,82
30°	5,96	3,16
20°	5,27	2,51
10°	3,89	1,88
0°	2,26	1,25
— 10°	0,70	

Der mit Leberextrakt bei 40° erhaltene Wert dürfte auf einem Versuchsfehler beruhen. Ähnliche Resultate hat Hanriot (C. r. **124**, 778; 1897) für seine Esterase aus Serum und Pankreas erhalten.

Schliesslich sei noch eine Versuchsserie von Chodat (Arch. sc. phys. nat. **23**, 13; 1907) erwähnt, welche die Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin betrifft.

In der zweiten Reihe sind die Zeiten angegeben, in welchen die Lösung eine gewisse Färbung angenommen hat.

Temperatur:	0°	10°	20°	30°	40°	45°	50°
Zeit (Minuten):	150	100	60	40	30	20	10

Sehr unsicher sind die quantitativen Temperaturangaben
von Tammann (l. c.) über Diastase und Rohrzucker,
von Lindner und Kröber (Chem. Ber. **28**, 1053; 1895) über Maltase,
von Hanriot und Camus (C. r. **124**, 235; 1897) über Serumesterase und Monobutyrin,
und von Miquel (siehe Herzog l. c.) über Urease,
sowie die mit der Mettschen Methode ausgeführten Versuche.

Es sei deshalb nur auf die Berechnung der betr. Versuche durch Herzog (Z. f. allg. Physiol. **4**, 189, 1904) verwiesen.

In der folgenden Tabelle sind die zuverlässigsten Angaben, welche über Temperaturkoeffizienten von Enzymreaktionen vorliegen, zusammengestellt[1]).

---

1) Komplizierte biologische Vorgänge, wie die Kohlenstoffassimilation grüner Blätter sind hier nicht aufgenommen worden.

Autor	Substrat und Enzym	Temperatur-Intervall	$k_{t+10} : k_t$	μ
Kastle u. Loevenhart (l. c.)	Äthylbutyrat, Esterase	20—30°	1,3	4650
Tammann (l. c.)	Rohrzucker, Invertase	20—30°	1,4	6000
Kjeldahl, Medd. fra Carlsberg Lab. 1881, 335	„ „	30—40°	1,5	7800
O'Sullivan u. Tompson (l. c.)	„ „	40—50°	1,4	6800
Senter, Z. physik. Chem. **44**, 257	H_2O_2, Katalase	0—10°	1,5	6200
Chodat (l. c.)	Tyrosin, Tyrosinase	20—30°	1,5	7200
Euler und af Ugglas (l. c.)	Rohrzucker, Invertase	0—20°	2,0	11000
Vernon, Journ. of. Physiol. **27**, 190	Stärke, Amylase	20—30°	2,0	12300
Vernon, „ „ „ „	Milch, Lab.	20—30°	2,1	13400
Vernon, „ „ „ **30**, 364	Wittes Pepton, Trypsin	15—25°	2,3	14300
Tammann (l. c.)	Salicin, Emulsin	15—25°	2,4	15000
Vernon, Journ. of Physiol. **30**, 364	Wittes Pepton, Erepsin	15—25°	2,6	16400
Taylor, Journ. Biol. Chem. **2**, 87	Triacetin, Lipase	18—28°	2,6	16700
Fuld, Hofm. Beitr. **2**, 169; 1908	Milch, Lab.	30—40°	3,2	22000
Bayliss, Arch. sciences biol. **9**, Suppl., 261	Kasein, Trypsin	20,7—30,7°	5,3	37500
	Heterogene Systeme.			
Aberson, Rec. Trav. Chim. **22**, 100; 1903	Zucker, leb. Hefe	18—28°	2,7	15600
Herzog, H. **37**, 160; 1902	„ Dauerhefe	15—25°	2,8	18000

Wie also als Ergebnis des Vorstehenden nochmals betont werden soll, ist der Einfluss der Temperatur auf enzymatische Reaktionen exakt definiert nur durch die Ermittelung der Inaktivierungskonstanten k_E bei gegebenen Temperaturen und die Messung der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion selbst, bei Temperaturen, welche wenigstens 20° tiefer liegen.

Recht instruktiv sind folgende von Gerber (Soc. Biol. **63**, 375; 1903) erhaltenen Zahlen; sie zeigen nämlich wie der Temperaturkoeffizient einer enzymatischen Reaktion von der Enzymmenge abhängen kann:

Konz. d. Lab-enzyms	Koagulationszeit der Milch bei verschiedenen Temperaturen						
	25°	30°	33°	36°	39°	42°	45°
	min. sek.	min. sek.	keine Koagul. nach 360 Min.	keine Koagul. nach 360 Min.	keine Koagul. nach 360 Min.	keine Koagulation nach 360 Minuten	
0,005	30 20	29 00	min. sek.	min. sek.	min. sek.		
0,010	14 45	11 30	7 00				
0,015	9 40	7 25	4 40	5 35			
0,020	7 30	5 00	2 30	3 15	5 30		
0,025	6 15	3 30	2 05	2 20	2 40		
0,030	4 40	2 50	1 40	1 30	1 40		
0,040	3 40	2 20	1 30	1 00	0 50	min. sek.	
0,050	3 00	1 50	1 10	0 55	0 40	2 05	
0,075	2 20	1 20	0 50	0 40	0 30	1 00	min. sek.
0,100	1 40	1 00	0 40	0 30	0 25	0 35	0 45

Auffallend ist das Ergebnis eines Vergleichs zwischen den Konstanten μ, welche man findet, wenn die Rohrzuckerinversion einmal durch eine Säure,

das andere Mal durch ein Enzym beschleunigt wird. Nach den Angaben der Tabellen S. 167 und 174 ergibt sich:

Rohrzucker-Salzsäure	Rohrzucker-Invertase
$\mu = 25600$	$\mu = 11000$

Obwohl der enzymatische Temperaturkoeffizient von sehr zuverlässigen Experimentatoren (Kjeldahl, Tammann und O'Sullivan und Tompson) bestimmt worden ist, waren doch neue Versuche über diesen Punkt wünschenswert. Verf. und Frl. B. af Ugglas haben deswegen den Temperaturkoeffizienten neu bestimmt und zwar unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Beim Optimum der Wasserstoffionenkonzentration fanden wir $k_{20} : k_{30} = 1{,}9—2{,}1$. Dies stimmt mit einer gelegentlichen Angabe von Visser (Zeitschr. physik. Chem. **52**), welcher für $k_{20} : k_{10}$ den Wert 2 ermittelte.

Man könnte zunächst den Schluss ziehen, dass in die Konstante μ die bei der Bildung der Verbindungen Rohrzucker-Salzsäure bezw. Rohrzucker-Invertase auftretende Wärmetönung eingeht. Indessen ist auch die Annahme möglich, dass der kleine Temperaturzuwachs bei der enzymatischen Inversion dadurch bedingt ist, dass die Invertase mit steigender Temperatur nicht nur irreversibel zerstört, sondern ausserdem noch — in umkehrbarer Weise — inaktiviert wird; abgesehen von dem zerstörten Anteil nähme also die Invertase nach der Rückkehr auf niedrigere Temperatur ihre alte Wirksamkeit wieder an. Die beteiligten Substrate Rohrzucker und Wasser würden also mit steigender Temperatur aktiver, das katalysierende Enzym dagegen inaktiver. Auch andere Reaktionen, wie z. B. die Esterspaltung besitzen bei der Katalyse durch Enzyme einen geringeren Temperaturkoeffizienten als bei der Katalyse mit Säuren. Mit dem Katalysator wechselnde Temperaturkoeffizienten fand bei nicht enzymatischen Reaktionen Slator, Zeitschr. physik. Chem. **45**.

Ein sehr schlecht definierter Punkt ist die sog. „Optimaltemperatur"; ihre Lage ist nämlich durchaus davon abhängig, welche Versuchszeiten bezw. welches Stadium der Reaktion man ins Auge fasst. Da ja bei der Optimumtemperatur das Enzym während der Reaktion schon teilweise zerstört wird, so liegt das Optimum offenbar um so tiefer, wenn man die Zeiten vergleicht, in welchen die Reaktion zur Hälfte abgelaufen ist, als wenn man nur etwa das erste Fünftel der Reaktion berücksichtigt. Die eigentliche Anfangsgeschwindigkeit wird überhaupt kein Optimum aufweisen, wenn nur die Beobachtungszeit kurz genug gemacht wird. Für praktische Zwecke kann es ja von Interesse sein, die Temperatur zu kennen, bei welcher die Reaktion am schnellsten abläuft, und es wäre dann wohl das Günstigste, die Zeiten zu berücksichtigen, nach welchen etwa 90 oder 95 % des Substrates gespalten sind. Jedenfalls müsste bei Angabe der Optimumtemperaturen gesagt werden, für welches Reaktionsstadium sie gelten.

Noch unbestimmter sind meist die Angaben über Tötungstemperaturen. Die Messungen haben nur dann einen Wert, wenn die Versuchszeit und die Grösse der Abschwächung bestimmt sind. Es wird sich also empfehlen, etwa diejenige Temperatur anzugeben, bei welcher das Enzym in 15 Minuten auf die Hälfte geschwächt wird; noch besser ist es, die Inaktivierungskonstante k_E des gelösten Enzyms bei einer gegebenen Temperatur zu messen.

Die Anwesenheit und Konzentration gleichzeitig gelöster Stoffe beeinflussen sowohl die Optimal- als Tötungstemperatur beträchtlich; besonders bringen schon Spuren von Säuren oder Basen starke Veränderungen hervor; jedenfalls wird man entschieden Einspruch dagegen erheben müssen, wenn Enzyme auf Grund von Verschiedenheiten in der Temperaturempfindlichkeit charakterisiert und individualisiert werden. Man vgl. z. B. das Verhalten verschiedener Blutkatalasen nach van Italie (Soc. Biol. **60**, 148).

Auch die recht grossen Verschiedenheiten, welche nach R. Huerre (C. r. **148**, 300; 1909) die Maltase des weissen und des gelben Maises aufweist, kann sehr wohl durch irgendwelchen Fremdstoff veranlasst sein.

Hiermit soll jedoch keineswegs in Abrede gestellt werden, dass beide Maissorten verschiedene Maltasen enthalten können.

Für die Mehrzahl der Enzyme wird eine Optimaltemperatur angegeben, welche sich etwa zwischen 37° und 53° befindet, während die „Tötungstemperaturen“ zwischen 60° und 75° liegen sollen.

Manche Oxydasen vertragen auffallend hohe Wärmegrade. Der als Medicago-Laccase bezeichnete Stoff ist überhaupt hitzebeständig, wie ja der Zusammensetzung nach zu erwarten ist (vergl. S. 42). Andere Oxydasen werden erst bei 80°—90° zerstört (Kastle, Chem. Zbl. **77**, I, 1554; 1906).

Auch Peroxydasen werden, in den natürlichen Säften wenigstens, durch Erwärmen nur wenig geschädigt. So zeigte ein Vorversuch mit Meerrettichpresssaft, dass zweistündiges Erhitzen auf 60° die Wirksamkeit der Peroxydase auf Guajakonsäure nur im Verhältnis 7 : 5 erniedrigt hatte. Für μ fanden wir den sehr niedrigen Wert 4000.

Noch resistenter scheint Myrosin zu sein, welches nach einem Versuch von Guignard (C. r. **111**, 249 u. 920; 1890 und Bull. Soc. Bot. de France (3) 418; 1894) bei 81° noch nicht zerstört wird, wobei freilich eine Angabe der Erhitzungszeit erwünscht wäre.

Ein eigentümliches Verhalten hohen Temperaturen gegenüber haben Delezenne, Mouton und Pozerski (Soc. Biol. **60**, 68 u. 390; 1906) beim Papain beobachtet. Bei gewöhnlichen Temperaturen, bis zu 40° hinauf übt Papain keine Verdauungswirkung auf Eieralbumin oder Blutserum aus. Erst bei weiterer Erhitzung der Lösung tritt Verdauung und zwar mit rapider Geschwindigkeit ein. Diese Resultate werden von Jonescu völlig bestätigt (Biochem. Z. **2**, 177; 1906), der die Unterschiede der gewöhnlichen und der

„Hitzeverdauung“ studiert und auch Gerber (Soc. Biol. **66**) fand neuerdings die auffallende Widerstandsfähigkeit des Papains hohen Temperaturen gegenüber.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wärmeempfindlichkeit der Enzyme zwar sehr gross ist, dass dieselbe aber doch nicht den Grad erreicht wie die der Toxine, wo Madsen für die freiwillige Zersetzung in Lösung Temperaturkonstanten bis zu $\mu = 198500$ fand.

Enzymatische Reaktionen scheinen einen etwas geringeren Temperaturkoeffizienten zu haben als entsprechende nicht enzymatische Katalysen.

Einfluss der Bestrahlung.

Die mannigfaltige Einwirkung, welche das Licht auf die Vorgänge in lebenden Zellen und Geweben ausübt, hat naturgemäss die Vermutung wachgerufen, dass die Enzyme für Strahlen verschiedener Wellenlänge empfindlich sind. Die Erfolge der modernen phototherapeutischen Methoden von Finsen u. a. einerseits, und andererseits die Erkenntnis, dass Toxine im Licht auffallend rasch zerstört werden, verleihen diesem Kapitel ein erhöhtes praktisches und wissenschaftliches Interesse.

Es mag nun gleich einleitend erwähnt werden, dass die Enzyme im allgemeinen keinen so hohen Grad von Lichtempfindlichkeit zu besitzen scheinen wie die Toxine. Zu diesem Ergebnis ist schon vor mehreren Jahren O. Emmerling gekommen (Chem. Ber. **34**, 3811; 1901).

Auch Hertel hat eine Reihe von Enzymen und Toxinen der Bestrahlung unterworfen und unter anderem gefunden, dass sowohl Trypsin wie Diastase und Labferment durch Strahlen der Wellenlänge 280 $\mu\mu$ geschwächt werden. Es zeigte sich aber auch bei dieser Untersuchung, dass die Enzyme zu ihrer Zerstörung eine bedeutend längere Zeit erfordern als die Toxine, und dass also Enzyme bedeutend photostabilere Stoffe sind als Toxine (Biol. Zbl. **27**; 1907).

Wie beim Studium der Thermolabilität der Enzyme sollten wir auch bei Untersuchung über Lichtwirkung unterscheiden zwischen der Lichtdestruktion, welche das Enzym selbst erleidet und der Änderung der Enzymwirkung unter dem Einfluss der Bestrahlung. Soweit sich aus den vorliegenden Ergebnissen ersehen lässt, ist der erstgenannte Einfluss der überwiegende; die beobachteten Hemmungen der Enzymwirkungen werden also der Hauptsache nach auf einer teilweisen Vernichtung des Enzymmoleküls beruht haben.

In seiner bereits erwähnten Arbeit gibt Emmerling an, dass Invertase, Laktase, Emulsin, Amylase, Trypsin[1]) und Pepsin von Tageslicht bei

[1]) Nach Fermi und Pernossi (Zeitschr. f. Hyg. **18**; 1894) werden Pepsin und Trypsin jedoch im Sonnenlicht geschwächt.

Ausschluss der Luft nur wenig geschädigt werden; etwas empfindlicher zeigten sich Hefemaltase und Lab. Bei letzterem Enzym war die Wirkungsfähigkeit der 1%igen wässerigen Lösung durch fünftägige Einwirkung von diffusem Sonnenlicht auf die Hälfte, durch ebenso lange Einwirkung von direktem Sonnenlicht auf ein Drittel gesunken.

Auch Downes und Blunt (Proc. Roy. Soc. **28**) finden nur geringe Lichtwirkung und Fr. Weis (Medd. Carlsberg-Lab. **5**) kam bezüglich der proteolytischen Enzyme des Malzes und Schmidt-Nielsen bezüglich des Chymosins (Medd. fra Finsens med. Lysinstitut; 1903) zum gleichen Resultat. Hingegen gibt F. G. Kohl (Beitr. z. Bot. Zbl. **23**; 1908) an, dass die Invertasewirkung schon durch zerstreutes Tageslicht deutlich gehemmt werde. Der Widerspruch zwischen dieser Behauptung und den früheren Befunden dürfte sich durch das Ergebnis von Jamada und Jodlbauer (Biochem. Z. 8) erklären; diese Forscher konnten feststellen, dass die sichtbaren durch Glas durchtretenden Strahlen des Sonnenlichtes für sich allein imstande sind, Invertase zu schädigen, aber ausgesprochen nur dann, wenn Sauerstoff zugegen ist.

Über die Stabilität der Katalase im Licht liegt eine umfassende Untersuchung von Lockemann, Thies und Wichern vor (H. **58**). Die hemmende Wirkung, welche das Licht auf die Blutkatalase sowohl während der Aufbewahrung der Blutlösung als auch während der Reaktion mit H_2O_2 ausübt, ist in folgender Weise von der Wellenlänge abhängig: Weiss > Blau > Rot > Dunkel [1]). Nach Zeller und Jodlbauer (Biochem. Z. 8) tritt jedoch auch hier eine erhebliche Schädigung durch sichtbare Strahlen nur dann ein, wenn Sauerstoff zugegen ist.

Zu einem analogen Ergebnis kamen Zeller und Jodlbauer und fast gleichzeitig Bach (Chem. Ber. **41**, 225) hinsichtlich der Peroxydase, auch hier wirken die sichtbaren Strahlen nur in Gegenwart von Sauerstoff.

Viel stärker hemmend als die sichtbaren Strahlen wirken nach einer grösseren Anzahl übereinstimmender Ergebnisse die ultravioletten Strahlen. Eine gründliche und wohl die erste Arbeit über die Einwirkung dieser Strahlen verdankt man R. Green (Trans. Roy. Soc. **188**, 167; 1897), welcher nachwies, dass Diastase durch dieselben zerstört wird, während die sichtbaren Strahlen im Gegenteil dieses Enzym durch Aktivierung des Zymogens fördern. Chymosin, Katalase und Peroxydase, welche wie erwähnt. durch sichtbare Strahlen nur wenig gehemmt werden, erleiden in ultravioletter Bestrahlung schnell eine dauernde Inaktivierung (Schmidt-Nielsen, Zeller

---

[1]) Zusätze von Natriumchlorid wirken in Abwesenheit von Katalase auf die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxydes durch Licht hemmend ein, steigern also die Lichtstabilität des Wasserstoffsuperoxydes. Für die Lichtempfindlichkeit der katalasefreien und katalasehaltigen Superoxydlösung findet Wo. Ostwald (Biochem. Z. **10**) folgenden Einfluss der Lichtart: Hell > Violett > Gelb > Dunkel.

und Jodlbauer). Signe und Sigval Schmidt-Nielsen haben die Destruktion des Labs durch ultraviolettes Licht in reaktionskinetischer Hinsicht eingehender studiert (H. **58**, 235; 1908); Georges Dreyer und Olav Hanssen (C. r. **145**; 1907) hatten kurz vorher gezeigt, dass die Zerstörung von Enzymen durch Bestrahlung nach dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen verläuft.

Von Schmidt-Nielsens Versuchen, welche im Finsen-Institut mit einer Quecksilberbogenlampe angestellt worden waren, seien im Folgenden einige wiedergegeben:

Zur Verwendung kamen 1%ige Lösungen eines käuflichen, trockenen Labpulvers und gemessen wurde die Zeit, welche nach einer gewissen Belichtungsdauer zur Koagulation von Kuhmilch erforderlich war. Diese Zeiten werden als direktes Maass für den Gehalt der Lösung an unverändertem Enzym angesehen.

Temperatur	Belichtungsdauer	Koagulationszeit	
°C	Minuten	Minuten	1000 k
24,2	0	8,5	—
24,2	1,0	23,5	442
24,2	1,5	39,25	443
24,2	2,0	71,0	461
0	0	7,7	—
12,75	1,0	19,5	405
12,80	1,5	34,5	434
12,85	2,0	59,0	442
13,90	2,0	56,0	431
12,95	2,0	54,5	425

Diesen Zahlen zufolge ist, wie ja zu erwarten war, die Lichtdestruktion des Labs unzweifelhaft eine monomolekulare Reaktion. Was aber besondere Beachtung verdient, ist der ausserordentlich kleine Temperaturkoeffizient dieser Lichtreaktion. Dass solche Vorgänge kleine Temperaturkoeffizienten besitzen, hat sich schon mehrfach gezeigt, wenn auch, was Trautz betont hat, keine allgemeine Gesetzmässigkeit vorliegt. Man wird den besprochenen Fall so deuten, dass die Temperatur der bestrahlten Chymosinmoleküle erheblich höher als die der umgebenden Lösung und in beiden Versuchsreihen nicht sehr verschieden ist. Die Temperatur der Lösung hätte also nur einen geringen Einfluss auf den Wärmezustand des bestrahlten Chymosins.

Die Reaktionskonstante fiel bei den Schmidt-Nielsenschen Versuchen mit steigender Konzentration; es ist dies nicht auffallend, wenn man sich erinnert, dass auch die Wärmedestruktion in konzentrierten Enzymlösungen langsamer verläuft als in verdünnten; Enzyme scheinen mit steigender Konzentration also nicht nur wärmestabiler, sondern auch lichtstabiler zu werden. Von der Gesamtwirkung der Strahlung der Quecksilberlampe treffen, wie

schliesslich erwähnt wird, 96% auf die Strahlen zwischen 220 und 250 $\mu\mu$ und nur etwa 0,3% auf die sichtbaren Strahlen.

Interessant sind die Versuche v. Tappeiners und seiner Mitarbeiter über die Einwirkung des Sonnenlichtes auf Diastasen und Invertin in Gegenwart von fluoreszierenden Substanzen (Sensibilisatoren). Schon sehr geringe Mengen Eosin, Magdalarot, Chinolinrot reichen hin, um einen stark schädigenden Einfluss des an sich unwirksamen Sonnenlichtes hervorzubringen.

Die Gärungsfähigkeit der Hefe wird in zerstreutem Tageslicht durch fluoreszierende Stoffe aufgehoben. Während aber die lebende Hefe sich den einzelnen fluoreszierenden Stoffen gegenüber auswählend verhält, riefen bei Acetondauerhefe und noch mehr bei Hefepresssaft alle untersuchten fluoreszierenden Stoffe, wie Eosin, Methylenblau, Fluoreszein, Dichloranthracendisulfonat u. a. durchgehends eine starke Abnahme des Gärungsvermögens hervor (v. Tappeiner, Biochem. Zeitschr. 8).

Auch auf Katalase wirkten sämtliche untersuchten fluoreszierenden Stoffe sensibilisierend, auf Peroxydase hingegen nur Eosin und Rose bengale, und beide Wirkungen treten nur ein, wenn die ultravioletten Strahlen möglichst fehlen (Jamada und Jodlbauer, Zeller und Jodlbauer, Biochem. Zeitschr. 8. — Karamitsas, Diss. München 1907).

Man kann mit Jodlbauer und v. Tappeiner (vergl. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1906) zwei Arten von biologischer Lichtwirkung unterscheiden: Die eine ist an die Anwesenheit von Sauerstoff geknüpft und wird durch fluoreszierende Substanzen beschleunigt. Die andere wird nur durch ultraviolette Strahlen hervorgerufen, ohne dass Sauerstoff oder fluoreszierende Substanzen eine Rolle spielen.

Von Röntgenstrahlen werden Enzyme nicht gechwächt. P. F. Richter und Gerhartz (Berl. klin. Woch. 1908) haben dies an Chymosin, Hefe, Pepsin, Pankreatin und Papayotin geprüft, und Lockemann, Thies und Wichern haben das gleiche Ergebnis an Blutkatalase gewonnen.

Radiumstrahlen und Radiumemanation scheinen dagegen nicht ohne Einwirkung auf Enzyme zu sein. Tyrosinase wird allerdings von Radiumstrahlen nach Wilcock (Journ. of Physiol. **34**; 1907) nicht geschwächt, nach Schmidt-Nielsen übt auf Chymosin sogar ein sehr kräftiges Radiumpräparat nur eine sehr schwache Wirkung aus, und Henri gibt nur an, dass Emulsin und Trypsin nicht geschädigt werden (C. r. **139**). Diesen Angaben gegenüber steht aber eine Reihe positiver Ergebnisse:

Zuerst haben Bergell und Bickel (Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden 1906) gezeigt, dass die peptische Verdauung durch Emanation gefördert wird. Neuberg (Verhdl. d. Deutsch. path. Ges. 1904) und Wohlgemuth (ebenda) fanden eine Beschleunigung der autolytischen Vorgänge durch Radiumbestrahlung, und Loewenthal und Edelstein (Biochem.

Zeitschr. **14**) die Begünstigung dieses Vorganges durch Emanation. Ganz neuerdings wiesen nun Loewenthal und Wohlgemuth (Biochem. Zeitschr. **21**) nach, dass die Radiumemanation imstande ist, die Wirkung des diastatischen Enzymes, sei es des Blutes, der Leber, des Speichels oder des Pankreassaftes zu begünstigen. „Diese Begünstigung ist nicht immer sofort zu beobachten, sondern sehr oft begegnet man während der ersten 24 Stunden einer Hemmung, die sich im weiteren Verlauf allmählich ausgleicht, und erst bei genügend langer Fortführung des Versuchs findet man eine Beschleunigung. In einer anderen Reihe von Fällen war unter dem Einfluss der Emanation nur eine Hemmung zu konstatieren, die sich selbst bei noch so langer Ausdehnung des Versuches nicht wieder auszugleichen vermochte."

Kap. VI.

Chemische Statik bei Enzymreaktionen.

Die Gleichgewichtslage eines chemischen Systems wird bekanntlich durch das Massenwirkungsgesetz geregelt.

Wenn 1 Molekül Essigsäure mit 1 Molekül Alkohol reagiert, so dass 1 Molekül Ester und 1 Molekül Wasser entstehen, so ist dem Massenwirkungsgesetz zufolge

$$\frac{[\text{Ester}]}{[\text{Säure}]\,[\text{Alkohol}]} = K,$$

wenn durch [ ] die Konzentration der in verdünnter wässriger Lösung befindlichen Stoffe bezeichnet wird, und K die Gleichgewichtskonstante bedeutet. Nach van't Hoff kommt das chemische Gleichgewicht der obigen Reaktion dadurch zustande, dass die Geschwindigkeit v_1 der Esterbildung gleich der Geschwindigkeit v_2 der Esterzersetzung ist, dass also

$$v_1 = k_1\,[\text{Säure}]\,[\text{Alkohol}] = v_2 = k_2\,[\text{Ester}]$$

und dass somit

$$\frac{[\text{Ester}]}{[\text{Säure}]\,[\text{Alkohol}]} = K = \frac{k_1}{k_2}.$$

Die Gleichgewichtslage ist unabhängig von der Schnelligkeit, mit welcher sie erreicht wird, unabhängig — wie genaue Versuche gezeigt haben — von der Gegenwart und Konzentration eines Katalysators, sofern dieser durch die Komponenten des Systems nicht in merkbarer Weise gebunden wird.

Wie im Kapitel IV (S. 91) bereits erwähnt wurde, sind zahlreiche Forscher zu der Auffassung gelangt, dass enzymatische Reaktionen durch die Verbindung zwischen Enzym und Substrat vermittelt werden.

Bei den bisher studierten nicht enzymatischen Hydrolysen, wo nach der Theorie des Verf. die Vermehrung der aktiven Moleküle durch die Salzbildung des Substrates mit der katalysierenden Säure eintritt, ist die Konzentration der Verbindung Substrat-Katalysator so gering, dass weder die Konzentration des Substrates und des Katalysators dadurch erheblich ge-

ändert wird, weder im Verlauf der Reaktion noch nach deren Ablauf, im Gleichgewicht.

Enzymatische Spaltungen unterscheiden sich meist von den durch anorganische Katalysatoren bewirkten dadurch, dass ihre Geschwindigkeit nicht nur durch die absolute Konzentration des Katalysators (Enzyms) bestimmt wird, sondern auch viel stärker vom Konzentrationsverhältnis Enzym-Substrat abhängt. Befindet sich die Substanz im Überschuss, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit ungefähr proportional der Enzymkonzentration; ist das Enzym im Überschuss vorhanden, so wird die Geschwindigkeit angenähert proportional der Substanzkonzentration, in jedem Falle scheint die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des „Zwischenproduktes“ proportional zu sein.

Andererseits hat das quantitative Studium der Enzymreaktionen ergeben, dass auch die Reaktionsprodukte durch Enzympräparate gebunden werden (Henri, Bodenstein u. a.).

Es frägt sich nun, wie die Verhältnisse bei den Endzuständen enzymatischer Reaktionen liegen.

Mit der Annahme von reaktionsvermittelnden Molekülen Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukt ist ausgesprochen, dass die Wechselwirkung zwischen diesen Molekülarten sehr viel rascher erfolgt, als diejenige zwischen den freien Substratmolekülen und ihren Spaltprodukten. Es sind also in erster Linie die Konzentrationen der Molekülarten Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukt, welche den Endzustand bedingen.

Es sei zunächst die vereinfachende Annahme gemacht, dass sich in der Zeiteinheit ebensoviele Moleküle Enzym-Substrat wie Moleküle Enzym-Reaktionsprodukte an der Reaktion beteiligen. Die Geschwindigkeitskonstante k_1 der Substratzersetzung ist proportional der Konzentration der Moleküle Enzym-Substrat, oder wenn

$$K_1 = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}]\ [\text{Substrat}]}$$

so ist

$$k_1 = K_1\ [\text{Enzym}]\ [\text{Substrat}].$$

In gleicher Weise wird die Geschwindigkeitskonstante der Substratbildung ausgedrückt durch

$$k_2 = K_2\ [\text{Enzym}]\ [\text{Reaktionsprodukte}]^2,$$

wenn, wie oft der Fall ist, aus einem Molekül Substrat 2 Moleküle Reaktionsprodukt entstehen.

Nach van't Hoff ist dann das Gleichgewicht gegeben durch den Quotienten

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{K_1\ [\text{Substrat}]}{K_2\ [\text{Reaktionsprodukte}]^2}.$$

Der numerische Wert dieses „enzymatischen“ Endzustandes fällt nun, wie unmittelbar ersichtlich ist, mit dem Wert des natürlichen stabilen Gleich-

gewichtes, wie es etwa durch einen anorganischen Katalysator erreicht wird, nur dann zusammen, wenn $K_1 = K_2$, also nur für den Fall, dass die Bindungen Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukte gerade gleich stark sind. Für eine solche Annahme liegt aber bis jetzt kein Anlass vor, im Gegenteil sind z. B. die von Henri mit Invertase erhaltenen Resultate so gedeutet worden, dass dieses Enzym von Rohrzucker, Glukose und Fruktose verschieden stark gebunden wird.

Lässt man die obige vereinfachende Annahme fallen, dass von den beiden „aktiven" Molekülarten in der Zeiteinheit gleich viele reagieren, sondern mögen in gleichen Zeiten von den Enzym-Substratmolekülen n % und von den Enzym-Reaktionsproduktmolekülen m % reagieren, so wird

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{K_1 n \ [\text{Substrat}]}{K_2 m \ [\text{Reaktionsprodukte}]^2}$$

und K wird identisch mit den stabilen Gleichgewichtskonstanten, wenn $K_1 n = K_2 m$.

Man wird also im allgemeinen erwarten dürfen, dass Enzyme zu einem anderen Endzustand führen, als organische Katalysatoren, und es ist dann zu fragen, wie weit sich der enzymatische Endzustand vom natürlichen Gleichgewicht entfernt. In einer Reihe von Fällen ist die direkte Feststellung des natürlichen Gleichgewichtes möglich, so z. B. beim System Fettsäure, Alkohol, Ester, Wasser. Man kann zur Beschleunigung der Einstellung des Gleichgewichtes als Katalysator eine starke Mineralsäure verwenden, da bekanntlich durch einen derartigen idealen Katalysator die Lage des Gleichgewichtes nicht geändert wird. In anderen Fällen kann man eine Vorstellung über die Lage des Gleichgewichtes aus der Wärmetönung der Reaktion gewinnen (van't Hoff, Berl. Sitz. Ber. 1909).

Enzymatische Vorgänge sind, wie oben gezeigt, meist von sehr kleiner Wärmetönung begleitet. Für derartige Umwandlungen liegt aber das Gleichgewicht bekanntlich einfach. „Die optischen Antipoden, welche kein Racemat bilden, sind hier wohl das ideale Beispiel, und theoretisch wie experimentell hat sich gezeigt, dass im festen Zustand beide Antipoden miteinander im Gleichgewicht sind und in Dampf, Schmelze und Lösung also die beiden Antipoden in gleicher Menge eine inaktive Mischung bilden. Thermodynamisch lässt sich der Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstanten K, also dem Quotienten der Konzentrationen der beiden Antipoden und der Umwandlungsarbeit E so ausdrücken (van't Hoff, Svenska Vet. Akad. Handl. 1886):

$$\ln K = -\frac{E}{2T}.$$

Hier ist also $E = 0$ und $K = 1$.

Was nun bei optischen Antipoden streng zutrifft ist bei Reaktionen mit kleiner Wärmetönung noch annähernd der Fall, und das Gleichgewicht liegt unweit des für Thermoneutralität gültigen.

Das bis 1892 vorliegende Versuchsmaterial hat Tammann (H. **16**) in einer umfassenden und grundlegenden Arbeit mit eigenen Versuchen zusammengestellt. Hauptsächlich aus seinen eigenen Versuchen leitet Tammann den wesentlichen und zweifellos richtigen Satz ab, dass der Endzustand der Enzymreaktionen nicht mit dem stabilen Gleichgewichtszustand der betr. Reaktionen zusammenfällt.

Über die sich unter dem Einfluss von Lipasen einstellenden Endzustände liegen zwei neuere Arbeiten vor:

Bodenstein und Dietz (Z. f. Elektroch. **12**) haben das Gleichgewicht, welches sich zwischen Amylbutyrat, Wasser, Amylalkohol und Buttersäure einstellt, mit dem Endzustand verglichen, welchen dieses System unter der Einwirkung der Lipase erreicht. Die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2, mit welchen die Bildung und die Spaltung des Esters verläuft, sind bereits S. 111 angeführt. Es ergaben sich die Mittelwerte:

$$k_1 = 0{,}015 \qquad k_2 = 0{,}0072$$

Wie es die Theorie fordert, war der Quotient dieser beiden Geschwindigkeitskonstanten gleich der direkt bestimmten Gleichgewichtskonstanten [1]).

Also $$\frac{k_1}{k_2} = K.$$

Der so auf zweierlei Weise ermittelte Endzustand zeigte indessen starke und regelmässige Abweichungen vom natürlichen, stabilen Gleichgewicht. Während nämlich die natürliche Gleichgewichtskonstante 1,96 beträgt, ergaben die Enzymversuche:

Anfangskonzentration der reagierenden Substanzen	K
0,05	0,45
0,10	0,74
0,20	1,12

Da der Endzustand von beiden Seiten erreicht wurde, ist der Beweis erbracht, dass es sich nicht um Reaktionsverzögerungen handelt.

Leider lassen sich diese Daten zur Prüfung obiger Beziehnungen ( ) und ( ) rechnerisch nicht weiter verwerten, da bei den Dietzschen Versuchen ein wirklich heterogenes (makroheterogenes) System vorlag.

A. E. Taylor (Journ. Biol. Chem. **2**, 87; 1906) scheint mit einer etwas feiner verteilten Suspension, gleichfalls von Rizinuslipase, gearbeitet zu haben. Er verwandte zu seinen Versuchen das Triacetin, das Triglycerid der Essigsäure. Die natürliche Gleichgewichtslage ist von Taylor für 0,5, 1,0 und 2,0%ige Lösungen von Triacetin bestimmt worden;

---

[1]) Da Wasser und Amylalkohol im Überschuss vorhanden waren, so vereinfacht sich die Konstante K zu

$$K = \frac{[\text{Amylbutyrat}]}{[\text{Buttersäure}]}.$$

er liess gleiche Volumen von 1 norm. Schwefelsäure und der Triacetinlösung mehrere Monate stehen und fand dann:

Anfangskonzentration des Esters	Zusammensetzung im Gleichgewicht
0,5 %	12 % Ester, 88 % gespalten
1,0 %	18 % „ 82 % „
2,0 %	22 % „ 78 % „

Für den enzymatischen Endzustand ergaben sich folgende Zahlen:

Anfangskonzentration des Esters	Zusammensetzung im Endzustand
0,5 %	14 % Ester, 86 % gespalten
1,0 %	21 % „ 79 % „
2,0 %	30 % „ 70 % „

Taylor selbst schliesst aus diesen Zahlen, dass das Enzym den Gleichgewichtszustand nicht verschiebt; indessen sind die Differenzen zwischen den zwei obigen Zahlenreihen doch so gross und regelmässig, dass sie nach Ansicht des Verf. nicht für die Identität des natürlichen und des enzymatischen Gleichgewichts sprechen. Die Frage, ob eine solche Differenz allgemein existiert und wie sie mit den Konzentrationen der Enzyme und Substrate zusammenhängt, ist übrigens von grösstem Interesse, so dass diesbezügliche Versuche in hohem Grade lohnend erscheinen.

Quantitative Bestimmungen enzymatischer Endzustände, welche sich mit dem natürlichen Gleichgewicht vergleichen liessen, liegen sonst kaum vor. Pomeranz (Wien. Sitzungsber. Abt. II B. **111**, 554; 1902) hat zwar aus den Resultaten von Hill über das Gleichgewicht zwischen Maltose und Glukose Gleichgewichtskonstanten berechnet, welche gute Übereinstimmung untereinander zeigen. Indessen ist dieser Endzustand qualitativ noch keineswegs klar und ausserdem stehen entsprechende berechenbare Versuche über die nicht enzymatische Gleichgewichtslage noch aus.

Einstweilen kann man wohl vermuten, dass enzymatischer Endzustand und stabiles natürliches Gleichgewicht eines chemischen Systems nur unter gewissen Bedingungen identisch sind.

Experimentell hat Tammann die Abhängigkeit des Endzustandes von der Menge des Enzyms und der Reaktionskomponenten eingehend untersucht und festgestellt. Bei der Einwirkung von Emulsin auf Arbutin und Coniferin ergab sich, dass die im Endzustand gespaltene Substanzmenge mit wachsender Enzymmenge wächst und schliesslich ein Maximum erreicht. Dies deutet darauf hin, dass mit steigender Enzymkonzentration die Menge der aktiven Moleküle Enzym-Reaktionsprodukte stärker zunimmt als die der Moleküle Enzym-Substrat.

Löst man gleiche Emulsinmengen und verschiedene Mengen von Amygdalin in 25 ccm Wasser, so werden bei 40° folgende Amygdalinmengen zersetzt:

Ursprüngliche Amygdalinmenge	Davon werden gespalten	
	Absolute Mengen	Prozentische Mengen
0,51 g	0,11 g	20 %
1,02 „	0,15 „	15 %
2,04 „	0,24 „	12 %

Ähnliche Verhältnisse findet man für die Endzustände der Reaktionen bei der Wirkung von Emulsin auf Arbutin wieder. In 100 ccm Lösung befanden sich 0,0625 g Emulsin und folgende Arbutinmengen bei 35°.

Ursprüngliche Arbutinmenge	Nach 48 Stunden gespalten	Nach 72 Stunden gespalten
0,576 g	52,3 %	52,3 %
4,000 „	44,0 „	44,0 „

Bei konstanter Enzymmenge wurde in verdünnten Lösungen von Amygdalin und Arbutin relativ mehr gespalten als in konzentrierten Lösungen; für die Spaltung des Coniferins durch Emulsin gilt wahrscheinlich dieselbe Beziehung.

Es erhebt sich nun die Frage, in welchen Grenzen der Endzustand eines enzymatischen chemischen Systems veränderlich ist. Dass diese Grenzen recht weit sein müssen, geht wohl unmittelbar aus den mitgeteilten Tatsachen hervor. Sie hängen nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Vorgeschichte der Enzyme ab.

Unter den biologisch wichtigen Gleichgewichten, an welchen starke Änderungen beobachtet werden, ist besonders dasjenige zwischen Stärke und Zucker in der lebenden Pflanze zu erwähnen. Schon bei geringfügigen Variationen der Temperatur oder durch Narkose wird die Stärkesynthese in hohem Grade beeinträchtigt, nicht aber die Hydrolyse. Man kann sich diese Erscheinungen in zweifacher Weise erklären:

Entweder man könnte zwei verschiedene Enzyme annehmen, von welchen das eine die Synthese, das andere die Hydrolyse regelt; dies ist natürlich nur denkbar unter der Annahme, dass sich von beiden Enzymen verschiedene Mengen vorzugsweise mit der Stärke bezw. mit dem Zucker verbinden, sodass also sowohl Stärke als auch Zucker an zwei Gleichgewichten teilnimmt:

$$[\text{Enzym a}]\,[\text{Stärke}] = k_m\,[\text{Enzym a-Stärke}]$$
$$\text{und } [\text{Enzym b}]\,[\text{Stärke}] = k_n\,[\text{Enzym b-Stärke}].$$

Gelten entsprechende Gleichgewichte für die Verbindungen der beiden Enzyme mit dem Zucker, so ist leicht einzusehen, dass zwei enzymatische Endzustände entstehen, welche sehr verschiedene Werte annehmen können. Sie stehen miteinander nur durch die Totalkonzentration der Stärke in Zusammenhang. Einer solchen Annahme steht nichts Tatsächliches entgegen, andererseits aber sind keine experimentellen Beweise für dieselbe beigebracht. Von idealen Katalysatoren würden sich dann allerdings die Enzyme sehr weit entfernen.

Oder man wird zu prüfen haben — wie Verf. an anderer Stelle (Pflanzenchemie II u. III S. 237) betont hat — ob nicht vielleicht die Annahme eines einzigen Katalysators bezw. einer einzigen Gleichgewichtskonstante ausreicht. Die verschiedenartige Weise, in welcher die entgegengesetzten Vorgänge des Aufbaues und des Abbaues auf äussere Einflüsse reagieren, wäre dann auf die durchaus verschiedene Beschaffenheit der Medien zurückzuführen, in welchen Kondensationen und Hydrolyse verlaufen. Wir denken uns dabei den Katalysator und die reagierenden Stoffe zwischen den wässerigen Zellsaft und das protoplasmatische Hydrosol verteilt. Im ersteren kann zufolge des grossen Wasserüberschusses die Hydrolyse sehr weit gehen; im lipoid- und proteinreichen Protoplasten löst sich aber verhältnismässig so wenig Wasser, dass bei einer bestimmten, erreichbaren Grösse der Zuckerkonzentration die entgegengesetzt gerichteten Reversionen vorherrschen.

Kap. VII.

Enzymatische Synthesen.

Van't Hoffs 1898 ausgesprochene Vermutung, dass Enzyme auch chemische Synthesen auszuführen bezw. zu beschleunigen vermögen (Zeitschr. anorg. Chem. **18**, 1; 1898), ist in den zehn seither verflossenen Jahren durch zahlreiche Versuche bewiesen worden.

Im gleichen Jahre war es bekanntlich Croft Hill (Journ. Chem. Soc. **73**) gelungen, eine synthetische Wirkung der Hefemaltase nachzuweisen.

Croft Hill beobachtete, dass Hefemaltase durch monatlange Einwirkung auf eine 40%ige Glukoselösung bei 30° das Reduktions- und Drehungsvermögen derselben im Sinne einer Maltosebildung ändert. Bald darauf wies indessen Emmerling (Chem. Ber. **34**, 600 und 2207; 1901) nach, dass der von Croft Hill beobachtete Effekt nicht auf der Bildung von Maltose, sondern von Isomaltose und von dextrinartigen Produkten beruhte. Isomaltose wird selbst durch Maltase nicht wieder gespalten. Einen ähnlichen Fall beobachteten E. Fischer und E. F. Armstrong (Chem. Ber. **35**, 3144; 1902): Kefirlaktase synthetisiert aus Galaktose und Glukose nicht Laktose, sondern Isolaktose, welch' letztere durch Kefirlaktase nicht zerlegt wird. Schliesslich hat E. F. Armstrong (Proc. Roy. Soc. Ser. B. **73**, 516; 1904) durch interessante Beobachtungen noch Emmerlings oben erwähnten Befund ergänzt: Emulsin verhält sich Maltose gegenüber umgekehrt wie Maltase; es spaltet Isomaltose, aber synthetisiert Glukose zu Maltose. Diese Resultate haben Armstrong zu der Verallgemeinerung veranlasst, dass „Enzyme gerade diejenigen Moleküle aufbauen, welche sie nicht zu spalten vermögen."

Hier liegt ein Problem von wesentlicher theoretischer Bedeutung. Ist die Ansicht von Armstrong richtig, so hätte man anzunehmen, dass diejenigen Enzyme, welche ein chemisches Gleichgewicht von beiden Seiten aus herstellen, Gemische eines synthetisierenden und eines hydrolysierenden Enzymes darstellen; gegen die Zulässigkeit dieser experimentell allerdings nur schwach gestützten Hypothese kann prinzipiell wohl nichts eingewendet

werden, und wir werden noch auf Tatsachen zurückkommen, welche für eine derartige Zwei-Enzym-Theorie sprechen könnten. Hervorheben möchte ich allerdings, dass die experimentelle Grundlage dieser Angelegenheit noch insofern recht schwach ist, als Croft Hill gewöhnliche Brauerhefe angewandt hat, welche, wie Henry und Auld (Proc. Roy. Soc. **76**) gezeigt haben, Emulsin enthält. Dieses Emulsin könnte die Bildung der Isomaltase veranlasst haben. Indessen scheint eine andere Deutung der Bildung von Isomaltose und Isolaktose möglich.

Wie seit O'Sullivans und Tompsons Arbeiten bekannt ist und durch Hudson bestätigt wurde, entsteht bei der Hydrolyse des Rohrzuckers eine d-Glukose, welche durch ihr hohes Drehungsvermögen ausgezeichnet ist und von Tanret, dem man sehr eingehende Studien über diesen Zucker verdankt, als α-Glukose bezeichnet wurde; dieselbe geht allmählich in die ε-Glukose über. Diese ε-Glukose scheint ein Gleichgewicht zwischen α- und β-Glukose darzustellen. In wässeriger Lösung haben wir neben weniger α-Glukose relativ viel β-Glukose. Wird einer solchen Lösung ein Enzym zugesetzt, dessen synthetische Wirkung man studieren will, so steht demselben also ein Überschuss der β-Modifikation zur Verfügung, und es ist zu erwarten, dass die synthetische Biose den Glukoserest hauptsächlich in einer Modifikation enthält, welcher der β-Glukose entspricht. In geringerer Menge sollte gleichzeitig auch die der α-Hexose entsprechende Biose entstehen, worüber noch keine Beobachtung vorliegt. Worin die Unterschiede dieser Modifikationen bestehen, ist allerdings noch nicht bekannt.

Diese Auffassung ist mehrerer experimenteller Prüfungen fähig.

Man könnte hiernach zunächst erwarten, dass die aus Glukoselösungen synthetisierten Biosen, also Isomaltose u. a. direkt β-Glukose zurückliefern, worüber meines Wissens noch keine Angaben vorliegen, und dass das gleiche mit denjenigen Biosen und Glukosiden der Fall ist, welche den gleichen Enzymspaltungen unterliegen. Ferner sollte man erwarten, dass die Synthese der Maltose gelingt, wenn man von α-Glukose ausgeht, d. h. wenn man in einer ganz frisch bereiteten Glukoselösung und mit sehr kräftigem Enzym arbeitet, das die Synthese vollführt, bevor die Umwandlung von der α- in die β-Modifikation vollzogen ist[1]).

Bemerkenswert ist, dass Rohrzucker aus Glukose und Fruktose durch gewisse Invertasen entstehen soll (Visser, Zeitschr. physik. Chem. **52**; Kohl; Pantanelli, Rendic. Acad. d. Lincei **16**).

Abgesehen von den erwähnten auffallenden Tatsachen, die sich bezüglich der Synthese der Maltose und Laktose ergeben haben, liegen zahlreiche

---

[1]) In Rücksicht auf einige Bemerkungen in der Literatur ist jedoch hervorzuheben, dass die Bezeichnungen α-Glukose und α-Glukoside bis jetzt nicht miteinander verknüpft sind.

Angaben über enzymatische Synthesen vor, welche als reine Reversionen anzusehen sind.

Äthylbutyrat entsteht aus Buttersäure und Äthylalkohol durch Pankreaslipase (Kastle-Loevenhart, Amer. Chem. J. **24**).

Auch Glyzerinbutyrat bildet sich aus den Komponenten (Hanriot, C. r. **132**) und ebenso Amylbutyrat (Bodenstein und Dietz, Zeitschr. f. Elektroch. **12**).

Ausführliche Versuche über die Esterbildung aus Methylalkohol und Ölsäure durch Pankreaslipase verdankt man Pottevin (Bull. Soc. Chim. **35**, 693; 1906. — Ann. Inst. Pasteur **20**, 901; 1906). Dieselben zeigen unter anderem, dass das Gleichgewicht zwischen Glyzerin und Ölsäure unabhängig ist von der Menge des zugesetzten Enzyms.

Menge des angew. Pankreatins	Gebildete Menge Ester in % 1 Tag	2 Tage	20 Tage
1	8	56	84
2	12	66	82
5	21	66	84
10	43	74	85

Auf die Synthese eines wirklichen Fettes beziehen sich folgende Versuche. Sie geben über den Einfluss der angewandten Wassermenge Aufschluss.

40 g Ölsäure + 3 g Pankreaspulver.
Versuchsdauer 20 Tage. Temp. = 33°.

Angewandt				Esterifiziert in %
130 g	Glycerin +	0 g	Wasser	3
120 „	„ +	10 „	„	77
110 „	„ +	20 „	„	64
100 „	„ +	30 „	„	51
64 „	„ +	66 „	„	20
28 „	„ +	102 „	„	5
8 „	„ +	122 „	„	0

Glyzerintriacetat entsteht aus den Komponenten durch Ricinuslipase (Taylor, Journ. Biol. Chem. **2**, 87; 1906). Vergl. S. 111.

Amygdalin bildet sich aus Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose (Emmerling).

Benzaldehydcyanhydrin entsteht aus Benzaldehyd und Blausäure (Rosenthaler, Biochem. Z. **14** u. **18**).

Salicin wird aus Saligenin und Glukose durch Emulsin synthetisiert (Visser).

Triacetylglukose bildet sich aus Essigsäure und Glukose durch Pankreatin (Acree und Hinkins, Amer. Chem. J. **28**).

Glykogen bildet sich in Hefepresssaft aus Zucker (Cremer, Chem. Ber. **32**).

Ferner gehört hierher die von Maquenne (Bull. Soc. Chim. de Paris **35**; 1906) und von Wolff und Fernbach (C. r. **137**) studierte enzymatische Rückbildung von Amylose aus ihren Spaltprodukten. Vergl. hierzu das von Moritz und Glendinning beobachtete Gleichgewicht, welches sich unter Einwirkung der Malzdiastase einstellt (Journ. Chem. Soc. **61**). Vielleicht handelt es sich bei der gelegentlich von Overton beobachteten Rückbildung von Stärke in plasmolysierten Pflanzenzellen um eine ähnliche Enzymwirkung (Vierteljahrsschr. d. naturf. Ges. in Zürich **44**; 1899).

Die Bildung von Hippursäure aus Benzoesäure (Benzylalkohol) und Glykokoll durch Nierenextrakt haben Abelous und Ribaut beobachtet (Soc. Biol. **52**).

Was die Synthese von eiweissartigen Stoffen betrifft, so sind zunächst die Versuche über Plasteinbildung zu erwähnen, welche nunmehr sicher als Synthesen angesprochen werden dürfen.

Durch Danilewski ist festgestellt worden, dass Labferment in konzentrierten Lösungen von Wittepepton eigentümliche Eiweissniederschläge hervorruft. Dieses Phänomen, die „Plasteinbildung“, welches auch unter der Einwirkung von Pepsinpräparaten eintritt, wurde im Laboratorium Danilewskis weiter untersucht und hat seitdem die Aufmerksamkeit besonders russischer Forscher wie Sawjalow (Zbl. f. Physiol. **16**; 1902) und Okuneff (Dissert. Petersburg 1895) in Anspruch genommen; Kurajeff (Hofm. Beitr. **1** und **4**) fand die analoge koagulierende Eigenschaft des Papayotins. Lawrow und Salaskin (H. **36**) konnten feststellen, dass die in konzentrierten Wittepeptonlösungen unter Einwirkung von Magensaft eintretende Bildung von Niederschlägen bei allen Arten von Albumosen stattfindet. Lawrow hat dann noch in neuester Zeit unsere Kenntnisse über Plasteinbildung wesentlich erweitert (H. **51**). Nach ihm können ausser den Albumosen auch Substanzen vom Typus der Aminosäuren, und zwar am besten in schwach saurer Lösung koaguliert werden. Die Koagulosen zeigen qualitativ Eiweissreaktionen, unterscheiden sich aber von diesen durch einen Mindergehalt an Stickstoff.

Die Plasteinbildung steigt mit der Konzentration der reagierenden Lösungen und tritt besonders unter Bedingungen ein, welche die hydrolytische Spaltung der Eiweisskörper hindern.

Die Ausfällung der Plasteine kann möglicherweise als eine Aussalzung aufgefasst werden.

Nach allem scheint festzustehen, dass es sich bei der Danilewskischen Reaktion wirklich um eine synthetisierende Wirkung[1]) des Pepsins resp. Labfermentes handelt, wenn auch eine eigentliche Reversibilität der Pepsinwirkung, d. h. eine Rückbildung des Ausgangsmaterials nicht nachge-

[1]) Vergl. hierzu auch R. O. Herzog (H. **39**) und A. Nürnberg (Hofm. Beitr. **4**).

wiesen ist. Vergl. H. Bayer (Hofm. Beitr. 4) und Rosenfeld, welcher feststellte, dass sich Kaseinplastein hinsichtlich seiner Spaltprodukte wenigstens quantitativ vom Kasein unterscheidet (Hofm. Beitr. **9**, 215; 1906).

Eine interessante Pepsin-Synthese aus den Spaltprodukten des Kaseins teilte Robertson mit (Journ. Biol. Chem. **3**, 95; 1907). Er erhielt einen Körper mit einem P_2O_5-Gehalt von 3,17 %, welchen er als Paranuklein bezeichnet.

Taylor gelang es, eine enzymatische Synthese mit Trypsin durchzuführen. Er spaltete Protaminsulfat, welches aus Roccus linatus erhalten wurde, vollständig in die Komponenten und liess auf das Gemisch der Aminosäuren ein aus der Leber der Muschel Schizothaerus Nuttalii gewonnenes Trypsin einwirken.

Neuerdings beschreibt Taylor weitere Versuche, welche sowohl mit Glyzerinleberextrakt von Schizothaerus Nuttalii als mit Pankreatin (Grübler) angestellt worden sind. Das Substrat war wie früher aus Salminsulfat gewonnen worden. Nach 4 Monaten erwiesen sich die Lösungen noch keimfrei; nach Verdünnung mit 4 Teilen Wasser und Ansäuren mit Schwefelsäure gaben die Kontrollproben auf Zusatz von 3 Teilen absoluten Alkohols keine Fällung, während die beiden enzymhaltigen Lösungen dicke weisse Niederschläge gaben. Das Produkt wurde über das Pikrat gereinigt und zeigte eine mit Salmin nahe übereinstimmende Zusammensetzung.

Andeutungen einer synthetischen Wirkung des Trypsins auf die Spaltprodukte des Kaseins hat Bayliss erhalten (Arch. des Sciences Biol. **11**), und auch die übrigen, ziemlich zahlreichen Fälle, in welchen eine Verzögerung der Spaltungsgeschwindigkeit durch die Reaktionsprodukte beobachtet wurde, zeigen, dass sich ein reversibles Gleichgewicht einstellt.

Ein besonderes Interesse verdienen, sowohl an sich als in Hinsicht auf die S. 183 u. ff. gegebene Darstellung der enzymatischen Endzustände, die Versuche von Beitzke und Neuberg, welche gezeigt haben, dass durch subkutane Injektion von Emulsin (bei Kaninchen) Antiemulsin gebildet wird, welches imstande ist, Glukose zu Maltose oder einem maltoseähnlichen Disaccharid zu synthetisieren.

Könnte durch weitere Versuche erwiesen werden, dass unsere Enzympräparate im allgemeinen einen spaltenden und einen synthetisierenden Bestandteil enthalten, so würden sich vielleicht bezüglich der Antifermentbildung und Antifermentbindung die herrschenden Auffassungen modifizieren, und man wird, wenigstens in einer grösseren Anzahl von Fällen, dem chemischen Substrat und seinen Reaktionsprodukten die Vermittlerrolle beim Gleichgewicht zwischen Enzym und Antienzym zuschreiben müssen.

Antienzyme.

Mit den Toxinen haben viele Enzyme die Fähigkeit gemeinsam, den lebenden Organismus zur Bildung von Antikörpern zu veranlassen, welche die Wirkungen der Enzyme hemmen. Der erste Fall von Antienzymwirkung wurde 1893 von Hildebrandt beobachtet.

Antienzyme erscheinen ihren Wirkungen nach ebenso wie die Enzyme als organische Katalysatoren. Mit den Enzymen scheinen sie den wenigen sicheren Beobachtungen zufolge sowohl bezüglich der physikalischen Eigenschaften übereinzustimmen als hinsichtlich der chemischen Labilität. Sie sind, soviel bekannt, ungefähr ebenso unbeständig gegen höhere Temperaturen wie die Enzyme selbst. Zu den stabilsten Antienzymen gehört Rizinusantilipase, welche nach Bertarelli (Zbl. f. Bakt. und Parasitenkunde **40**) bei 70° noch nicht geschwächt wird und erst bei 80° ihre Wirksamkeit langsam einbüsst. Der Reinheitsgrad der Enzyme scheint auf die Antikörperbildung keinen Einfluss zu haben; ein Ko-Enzym scheint also zu dieser Reaktion nicht nötig zu sein.

Dieses Verhalten entspricht durchaus demjenigen der Antitoxine, welche im allgemeinen schon bei 70° geschädigt werden. Wie die Enzyme sind auch die Antitoxine im trockenen Zustand haltbarer als im gelösten.

Nach den vorliegenden physikalisch-chemischen Studien zu urteilen sind die Beziehungen zwischen Enzymen und Antienzymen im wesentlichen identisch mit denjenigen zwischen Toxinen und Antitoxinen. Indessen sollen Fragen, welche die Gleichgewichte der Toxine und ihrer Antikörper berühren, hier nicht diskutiert werden. Wegen der näheren Orientierung über diese interessanten Probleme sei besonders auf die Monographien von Arrhenius und von Michaelis verwiesen. Ich stelle die wichtigsten Tatsachen über Antienzyme deshalb zusammen, weil das Problem der Reversibilität der Enzymreaktionen mit den Antienzymwirkungen zusammenhängt.

Unter Antienzymen im engeren Sinne wären eigentlich nur die durch Immunisierung mit Enzymen im Organismus erzeugten spezifisch wirkenden Sekrete zu verstehen. Indessen enthält auch das normale Serum Substanzen, welche z. B. die Trypsinwirkung mehr oder weniger vollständig aufheben; dass diese von den durch Immunisierung hervorgerufenen Antikörpern wesentlich verschieden sind, ist nach den bis jetzt bekannten Tatsachen nicht wahrscheinlich; sie werden deswegen ebenfalls unter den Antienzymen besprochen. Dagegen sollen die hitzebeständigen und anorganischen Substanzen, welche die Enzymwirkung mehr oder weniger vollständig aufheben, nach einem Vorschlag Neubergs als Hemmungskörper bezeichnet werden.

Antisteapsin ist von A. Schütze (Ann. Inst. Pasteur **15**) dargestellt worden, welcher nach Injektion von Steapsin in zwei Fällen ein stark lipolytisch wirkendes Kaninchenserum erhalten konnte. Seine Versuche sind neuerdings

von Beitzke und Neuberg (Virch. Arch. **183**, 169; 1906) und von Bertarelli bestätigt worden.

Bertarelli (Zbl. f. Bakt. **40**, I) gelang es hingegen nicht, die den tierischen Lipasen aus Ochsenleber und Ochsenblutserum entsprechenden Antifermente zu erhalten, wohl aber gewann er durch Injektion verschiedener Pflanzenlipasen (Ricinuslipase, Nusslipase) aus Hundeserum ganz spezifisch wirkende Antilipasen. So beeinflusste die Antiricinuslipase weder die Serumlipase noch die Leberlipase, noch die Nusslipase.

Antiemulsin war das erste überhaupt bekannte Antienzym (Hildebrandt, Virch. Arch. **131**). Wie dieser haben Beitzke und Neuberg (Virch. Arch. **183**) ebenfalls Kaninchen immunisiert und aus dem Antifermentserum den Antikörper mit der Globulinfraktion ausgefällt. Die synthetische Wirkung dieses Präparates wird später besprochen werden.

Eine Immunisierung mit Diastase hat vielleicht schon Kussmaul beobachtet; indessen sind die Angaben unsicher (Arch. f. klin. Med. **14**). Auch die Arbeiten von Ascoli (H. **43**) haben zu keinem Resultat geführt.

Durch subkutane Injektion von Diamalt, einer käuflichen, aus Grünmalz hergestellten Enzymlösung, kann man im Serum von Kaninchen Substanzen erzeugen, welche die verzuckernde Wirkung der Diastase hemmen, während das Serum vorher invertierende Wirkung hat (Braun und Schütze, Med. Klin. 1907, Nr. 9, cit. nach Biochem. Zbl. **6**, 389; 1907).

Eine Antiinulinase hat Saiki durch Injektion erzeugt (Journ. Biol. Chem. III).

Eine Antiinvertase von allerdings schwacher Wirkung wurde neuerdings von Schütze und Bergell erhalten (Zeitschr. f. klin. Med. 1905). Auch eine Antilaktase hat Schütze (Z. f. Hyg. **48**; 1904) dargestellt, und zwar durch Injektion von Kefirlaktase unter die Haut von Kaninchen oder in den Brustmuskel des Huhnes; der Antikörper entsteht im Serum des betr. Tieres, in welchem er sich im normalen Zustand nicht findet.

Antipepsin. Sachs (Fortschr. d. Med. **20**, 425; 1902) konnte Gänse gegen Pepsin immunisieren und eine antipeptische Wirkung des Serums konstatieren, welche bis gegen die 20fache Menge Pepsin schützte.

Das von Weinland (Zeitschr. f. Biol. **44**, 45; 1903) entdeckte Antipepsin, welches als normales Sekret der Magenschleimhaut angesehen wird, entspricht dem normalen Antitrypsin des Blutserums. Es hemmt die Pepsinverdauung in vitro und soll die Selbstverdauung der Schleimhäute verhüten.

Der gleiche Autor hat im Presssaft von Ascaris Antifermente des Pepsins und Trypsins nachgewiesen; nach R. O. Herzog (H. **60**) werden durch Ascarispresssaft auch Labpräparate in ihrer Wirkung gehemmt.

Im Gegensatz zu diesen Antienzymen ist ein pepsinhemmendes Agens, das Blum im Magensaft gefunden hat, hitzebeständig.

Während Bergell und Schütze vergebens versucht haben, ein Antipankreatin zu gewinnen (Zeitschr. f. Hyg. **50**, 305; 1904), berichten neuerdings Jochmann und Kantorowicz in einer vorläufigen Mitteilung (Münch. med. Wochenschr. **55**; 1908) über ein Antienzym gegen das Pankreastrypsin, welches mit dem Antikörper gegen Leukocytenferment identisch sein soll. Die gleichen Forscher geben daselbst auch an, dass sich im Blut mindestens zwei Antipepsine finden, eines, welches die Serumeiweissverdauung hemmt und bei 80—85° zerstört wird, und ein zweites, wärmestabiles, das die Verdauung von erstarrtem Hühnereiweiss hindert.

Versuche zur Immunisierung gegen Papayotin sind bis jetzt missglückt (Bergell und Schütze, l. c. — v. Stenitzer, Biochem. Z. **9**).

Durch die Untersuchungen von Hahn (Berl. klin. Wochenschr. **34**, 499; 1897) und die fast gleichzeitigen von Pugliese und Coggi (Bollet. Scienze med. 8; 1897) ist zuerst festgestellt worden, dass normales Serum die tryptische Verdauung hemmt. Fermi hatte bereits beobachtet, dass Trypsin bald nach der Injektion verschwindet. Weitere Arbeiten hierüber liegen vor von Achalme (Ann. Inst. Pasteur **15**), Camus und Gley (Soc. Biol. **49**), Charrin und Levaditi, Simnitzki, Glaessner (Hofm. Beitr. **4**). Diese antitryptische Wirkung ist an das Serumalbumin gebunden (Landsteiner, Zbl. f. Bakt. **27**; 1900. — Cathcart, Journ. of Physiol. **31**, 497; 1904. — Hedin, Journ. of Physiol. **32**, 390; 1905). Bei einer Reihe von Krankheiten, wie Diabetes, Tuberkulose u. a. wurde erhöhte antitryptische Tätigkeit des Serums gefunden. (Brieger u. Trebing, Berl. klin. Wochenschr. 1908.)

Delezenne (Soc. Biol. **55**, 112; 1903) hat behauptet, dass die hemmende Wirkung des normalen Serums nicht einer direkten Einwirkung auf die proteolytischen Enzyme, sondern einer Neutralisation der entsprechenden Kinasen zuzuschreiben ist. Er beschreibt folgende Versuche:

Nach vorläufiger Bestimmung derjenigen Menge Serum, welche gerade die verdauende Wirkung einer Mischung von Pankreassaft und Darmsaft aufheben kann, werden 3 Röhren mit gleichen Mengen der zu verdauenden Substanz, der Pankreas-Darmsaft-Mischung und der zur Neutralisation hinreichenden Menge Serum gefüllt. Nach einigen Stunden überzeugt man sich, dass in keiner der Röhren Verdauung eingetreten ist, und fügt dann zur Röhre A einen Überschuss von Pankreassaft, zu B einen Überschuss von Magensaft; C dient als Kontrollversuch. Nun ergab sich, dass Verdauung hierauf nur in B eintrat. Delezenne zieht daraus den Schluss, dass bei der Verdauung durch die Pankreas-Darmsaft-Mischung nur der Darmsaft (der Kinase) neutralisiert war, und dass das Serum auf das Pankreasenzym selbst gar nicht einwirkt. Ascoli und Bezzola (Zbl. f. Bakt. **33**) kamen zu teilweise ähnlichen Ergebnissen.

Gegen diese Auffassung sind allerdings Einwände erhoben worden.

Nach Delezenne wäre das Antitrypsin eine Antikinase, und man könnte dann ausserdem noch die Existenz eines Antitrypsinogens erwarten. Einen derartigen Körper konnten aber Bayliss und Starling (Journ. of Physiol. **32**) nach subkutaner Injektion im Blutserum nicht nachweisen. Im übrigen wird gezeigt, dass normales Kaninchenserum ausser seinen antitryptischen Eigenschaften zuweilen auch die Fähigkeit besitzt, Enterokinase zu neutralisieren; diese Fähigkeit wird durch Injektion von Enterokinase gesteigert. Dagegen erhöht im Serum erzeugte „Antikinase" nicht dessen antitryptischen Eigenschaften.

Diese Beobachtungen wurden neuerdings durch E. Zunz bestätigt und erweitert (Bull. de l'Acad. R. de méd. de Belgique [4] **19**; 1905).

Normales Blutserum enthält übrigens nicht nur Antitrypsin, sondern auch ein proteolytisches Enzym, die Serumprotease, deren Wirkung aber durch das Antitrypsin gehemmt wird. Die Serumprotease lässt sich durch Salzfällung vom Antitrypsin trennen, da die Protease der Globulinfraktion, das Antitrypsin der Albuminfraktion folgt.

Dass die Antitrypsinmenge im Serum durch Injektion von Trypsinlösungen erheblich gesteigert werden kann, haben Achalme und Weinland (Zeitschr. f. Biol. **44**) gezeigt.

Die klinische Bedeutung der Tryptasen und Antitryptasen, auf welche hier nicht näher eingegangen werden kann, findet man in einem zusammenfassenden Bericht von G. v. Bergmann (Med. Klin. 1909) dargestellt.

Was die Wärmeempfindlichkeit der „Antiproteolase" betrifft, so scheint aus Versuchen von Vandevelde (Biochem. Z. **18**, 142; 1909) hervorzugehen, dass durch Erwärmen auf 55° eine Schwächung eintritt.

Antitryptische Wirkung zeigen nach Fermi (Zbl. f. Bakt. **50**) auch verschiedene Organgewebe und einige eiweisshaltigen Stoffe wie Eigelb und Milch; auch Kasein allein wirkt antitryptisch.

Antiurease. Normales (Kaninchen-) Serum und normaler eiweissfreier Harn üben, wie L. Moll (Hofm. Beitr. **2**) fand, eine konstante, hemmende Wirkung auf Urease aus. Dieselbe wird erheblich verstärkt durch Injektion kleiner Dosen eines Ureasepräparates aus Micr. ureae Pasteuri. Moll hält indessen die Antikörper des normalen und des immunisierenden Serums nicht für identisch, da letzteres das Plus seiner hemmenden Kraft durch einstündiges Erhöhen auf 65° (nicht aber auf 56°) verlor und diese auf die normale Grenze herabsank, während die hemmende Kraft des Normalserums weder durch einstündiges Erhöhen auf 65° noch durch sechsstündiges auf 56° alteriert wurde.

Die Antikörper der koagulierenden Enzyme. Die wichtige Entdeckung Morgenroths, dass subkutane Injektion von Lab in Serum

und Milch der immunisierten Tiere ein Antilab erzeugt (Zbl. f. Bakt. **26**, 349; 1899 und **27**, 721; 1900), hat das Studium dieser Antifermente angebahnt. Was speziell das Antilab betrifft, so haben Morgenroth, besonders aber Madsen und Walbum, sowie Bashford die Wirkung des Antilabs quantitativ untersucht, während wir Fuld und Spiro (H. **31**) eine eingehende Studie über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes verdanken. Arrhenius hat auf die Analogie hingewiesen, welche zwischen dem Verhalten der koagulierenden Enzyme und gewisser Präzipitine gegenüber den Antikörpern besteht. Hier kann daher von einer Darstellung der Gleichgewichtserscheinungen zwischen Lab, beziehungsweise Fibrin und ihren Antikörpern abgesehen werden.

Hervorgehoben soll nur werden, dass normales Serum mehrerer Tiere eine labungshemmende Substanz enthält, wie Hammarsten und Rödén bereits 1887 gefunden haben. Dieselbe ist jedoch nicht identisch mit der durch aktive Immunisierung erzeugten (Bashford, Journ. of Pathol. 8). Dieses im Pferdeblutserum enthaltene „Antilab" ist nach Fuld und Spiro ein Pseudoglobulin, welches dadurch wirkt, dass es einen Teil der Calciumionen bindet und so die Koagulation verzögert. Die genannten Autoren trennen das Chymosin und Antichymosin des normalen Blutes durch Ammoniumsulfatfällung.

Über die Beziehungen zwischen Antipepsin und Antilab vergleiche Jacoby (Biochem. Z. **4**).

Antifibrinferment. Bordet und Gengou (Ann. Inst. Pasteur **15**) gewannen diesen Antikörper folgendermaassen: Sie injizierten Meerschweinchen mit normalem Kaninchenserum; dadurch gewinnt das Meerschweinchenserum die Fähigkeit, die Koagulation des Kaninchenblutes zu verhindern, es ist also ein Antifibrinferment gebildet worden. Dasselbe wirkt, wie die genannten Forscher festgestellt haben, ziemlich ausgeprägt spezifisch auf die Sera der verschiedenen Tierarten. Durch Erwärmen auf 55° wird dieser Antikörper nicht beeinflusst.

Die Zusammensetzung des Antifibrinfermentes ist nicht näher bekannt.

Antilaccase glaubt Gessard (Soc. Biol. **55**) durch Injektion von Laccase im Kaninchenserum hervorgerufen zu haben. Die Kürze der Mitteilung macht eine Kritik des Versuches unmöglich.

Die Antikatalase von Batelli und Stern verhält sich wie Ferrisulfat (Soc. Biol. **59**) und dürfte den Hemmungskörpern zuzurechnen sein. Ein eigentliches Antienzym der Katalase scheint nicht zu existieren (De Waele und Vandevelde, Biochem. Z. **9**).

Während es mehrfach gelungen ist, im Tierkörper Antienzyme gegen pflanzliche Enzyme hervorzurufen (Magnus und Friedenthal), hat man

Pflanzen bisher zur nachweisbaren Bildung von Antienzymen nicht veranlassen können.

Die merkwürdigste Eigenschaft der Antienzyme im engeren Sinne liegt wohl in ihrer streng spezifischen Wirkung. Sie teilen dieselbe mit den Antitoxinen. Ob wir hier eine Eigentümlichkeit der im Organismus als Schutzmittel gebildeten Antikörper haben, oder ob es sich bei näherer Untersuchung herausstellen wird, dass die Antienzyme nur in gleichem Sinne spezifisch wirken wie die Enzyme, lässt sich zurzeit nicht entscheiden.

Wohl aber kann auf Grund des heute vorliegenden experimentellen Materiales behauptet werden, dass die Spezifität der Enzyme von derjenigen anderer Katalysatoren prinzipiell nicht abweicht.

Kap. VIII.

Die Spezifität der Enzymwirkungen.

Was die Frage betrifft, welche verschiedenen Enzympräparate eine und dieselbe Reaktion beschleunigen, so scheitert eine kritische Bearbeitung jetzt noch an der Unmöglichkeit, die physiologische Reinheit der Präparate zu beurteilen. Wenn also z. B. angegeben wird, dass Emulsin Fette spaltet, so heisst dies ja kaum etwas anders, als dass die betreffenden Präparate Lipasen enthalten, soweit nicht nachgewiesen wird, dass die glukosidspaltende und die fettspaltende Wirkung stets parallel gehen. Rein physiologische Gesichtspunkte müssen in ähnlichen Fällen einstweilen noch den Ausschlag geben, und dem Chemiker liegt heute die andere Frage näher, welche verschiedenen Reaktionen stets durch ein und dasselbe Enzympräparat und Enzym ausgelöst werden.

Die Forschungen der letzten Jahre haben es wahrscheinlich gemacht, dass in vielen Enzympräparaten, in welchen man früher ein einziges Enzym angenommen hat, eine Anzahl verschiedener Enzyme existiert, welchen ein kleineres Wirkungsgebiet zukommt. So wurde bereits S. 17 erwähnt, dass im Emulsin vermutlich drei Enzyme enthalten sind, ebenso enthält die Diastase vermutlich mehrere Enzyme, welche den Abbau der Stärke stufenweise bewerkstelligen.

Zunächst wird es als Spezifität bezeichnet, wenn die Wirkung eines Enzyms nur bei einzelnen Repräsentanten einer grösseren Körperklasse beobachtet wird.

Ein Teil dieser Fälle wird uns verständlich in dem Grade, in welchem wir den Verlauf des chemischen Vorgangs zu durchblicken vermögen. So ist die bekannte Tatsache, dass nur Zucker mit 6 und 9 Kohlenatomen, nicht aber z. B. Pentosen gärungsfähig sind, viel weniger auffallend, seitdem wir, besonders durch Buchner und Meisenheimer, eine Vorstellung von den Zwischenprodukten der alkoholischen Gärung erhalten haben.

Die vielfach hervorgehobene Spezifität der Oxydasen dürfte sich am leichtesten als die Folge rein chemischer Tatsachen ergeben.

Da, wo die Spezifität der Oxydasen am meisten betont wurde, nämlich bei den Phenolasen kann jetzt schon gesagt werden, dass die Angreifbarkeit der einfachen und substituierten Mono-, Di- und Triphenole in gleicher Weise von ihrer Konstitution abhängig ist, gleichgültig ob „Oxydasen" oder Manganverbindungen nicht enzymatischer Natur die oxydierenden Katalysatoren sind.

Hydrochinon wird — um das einfachste Beispiel zu wählen — am schnellsten oxydiert, Brenzkatechin erheblich langsamer und Resorzin ist gegen die Oxydation sehr widerstandsfähig. (Vergl. hierzu Bertrand, Bull. Soc. Chim. de Paris [3] **15**, 791; 1896).

Eine andere Gruppe von Fällen liefern die Lipasen. Durch Kastle und Loevenharts Messungen wissen wir, dass die esterspaltende Wirkung des Pankreasextraktes sich bei weitem nicht auf alle Ester erstreckt. Abgesehen davon, dass die Hydrolyse der eigentlichen Fette durch Pankreasextrakt nur sehr gering ist, wurden auch bei chemisch sich so nahestehenden Individuen wie Athylacetat und Äthylbutyrat ausserordentlich grosse Unterschiede in der Spaltungsgeschwindigkeit beobachtet. Eine Reihe weiterer derartiger Verschiedenheiten haben auch H. E. Armstrong und Ormerod mitgeteilt. Aber bei katalytischen Spaltungen liegen die Verhältnisse keineswegs anders. Nach R. Löwenherz verhielten sich z. B. die Konstanten der Hydrolyse (mit Salzsäure als Katalysator) für ameisensaures Äthyl und benzoesaures Methyl wie 1,1 : 0,0003, und grössere Differenzen würden sich noch leicht finden lassen. Dazu ist zu bemerken, dass eine sehr geringe Geschwindigkeit bei Enzymreaktionen überhaupt nicht zum Vorschein kommt, da in der erforderlichen langen Zeit das Enzym unwirksam wird.

Auch bei den Versuchen von H. Bierry und Giaja (C. r. **147**) über die Wirkung von Maltase und Laktase verschiedener Herkunft dürfte es sich mehr um quantitative Unterschiede in der Wirksamkeit als um qualitative Verschiedenheiten handeln; die Aufspaltung der Laktose, der Laktobionsäure und des Laktosazons wird durch ein kräftiges Präparat bewirkt, während ein anderes Präparat, welches nur Laktose spaltet, allgemein schwächer gewesen sein dürfte.

Über die Fähigkeit des Pankreassaftes Dipeptide zu spalten, haben Fischer und Abderhalden ein reichhaltiges Material geliefert (H. **46**, 52; 1905 und **50**, 264; 1907). Durch Pawlowschen Pankreassaft erwiesen sich nämlich als:

Hydrolysierbar [1])	Nicht hydrolysierbar
* Alanyl-glycin	Glycyl-alanin
* Alanyl-alanin	Glycyl-glycin
* Alanyl-leucin A	Alanyl-leucin B
* Leucyl-isoserin	Leucyl-alanin

[1]) Die mit * bezeichneten Peptide sind Racemkörper.

Hydrolysierbar	Nicht hydrolysierbar
Glycyl-l-tyrosin	Leucyl-glycin
Leucyl-l-tyrosin	Leucyl-leucin
* Alanyl-glycyl-glycin	Aminobutyryl-glycin
* Leucyl-glycyl-glycin	Aminobutyryl-Aminobuttersäure A
* Glycyl-leucyl-alanin	Aminobutyryl-Aminobuttersäure B
* Alanyl-leucyl-glycin	Aminoisovaleryl-glycin
Dialanyl-cystin	Glycyl-phenylalanin
Dileucyl-cystin	Leucyl-prolin
Tetraglycyl-glycin	Diglycyl-glycin
Triglycyl-glycinester (Curtius' Biuretbase)	Triglycyl-glycin
	Dileucyl-glycyl-glycin

Die Hydrolyse dieser Körper durch Säuren wird zweifellos ebenfalls grosse Unterschiede in der Spaltungsgeschwindigkeit aufweisen. Die Reihenfolge der Spaltbarkeit durch Enzyme und andere Katalysatoren ist aber keineswegs immer die gleiche, wie Versuche von Kastle und Loevenhart an Estern gezeigt haben. Die Auffassung, dass Enzyme und Säuren von verschiedenen Estern eben in verschiedenem Maasse gebunden werden, machen es durchaus verständlich, dass keine Parallelität beobachtet wird.

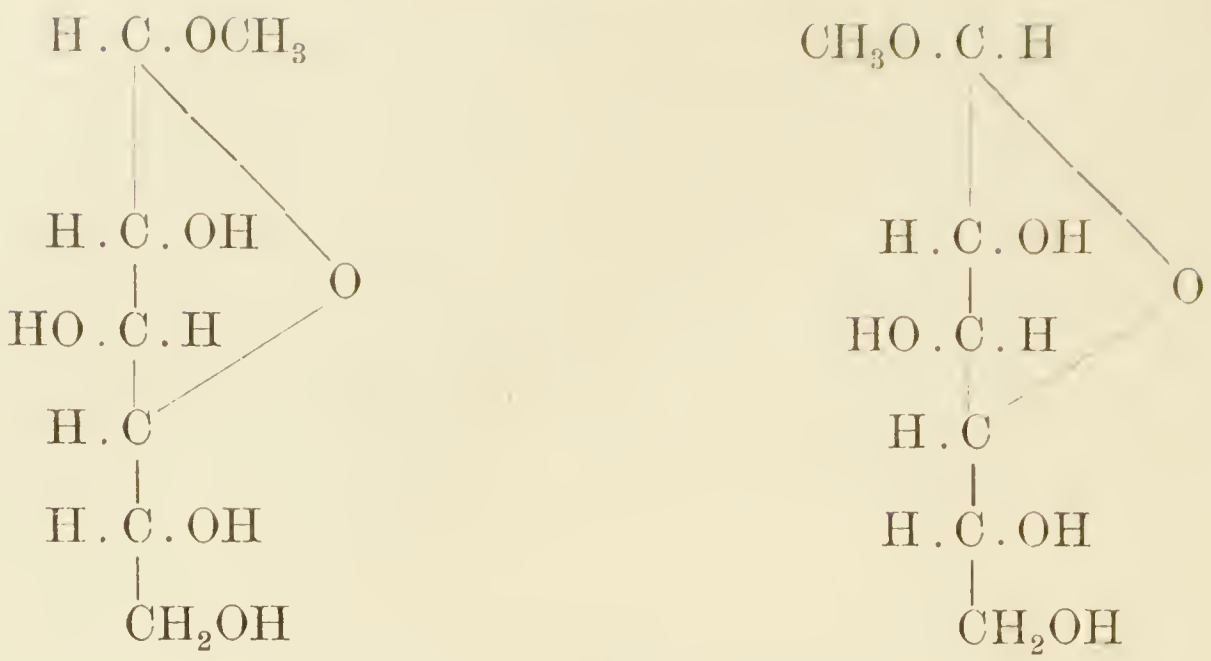
Die auffallendste Spezifität zeigen die Enzyme gegenüber optischen Antipoden.

Nachdem E. Fischer in einer grundlegenden Arbeit dargelegt hat, wie man durch rein chemische Synthesen zu neuen optisch aktiven Produkten gelangt (Chem. Ber. **27**, 3230; 1894), fiel damit der von Pasteur angenommene prinzipielle Unterschied zwischen der natürlichen und künstlichen Synthese. Vier Jahre später zog Fischer den Schluss, dass die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber durch den stereochemischen Bau der Enzyme bedingt sei (H. **26**, 60; 1898).

Er selbst fand, teilweise in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern, die auffallendsten Beispiele für den Einfluss der Konfiguration auf die Angreifbarkeit eines Substrates, nämlich die Spaltung der Methylglukoside.

Sowohl α- als β-Methyl-d-glukosid werden durch Enzyme angegriffen, dagegen bleiben α- und β-Methyl-l-glukosid unberührt. Während aber α-Methyl-d-glukosid nur der Spaltung durch Hefefermente unterliegt, greift Emulsin ausschliesslich das β-Methyl-d-glukosid an.

Allgemein werden, wie es scheint, α-Glukoside durch Maltase zerlegt, β-Glukoside durch das Mandelemulsin.



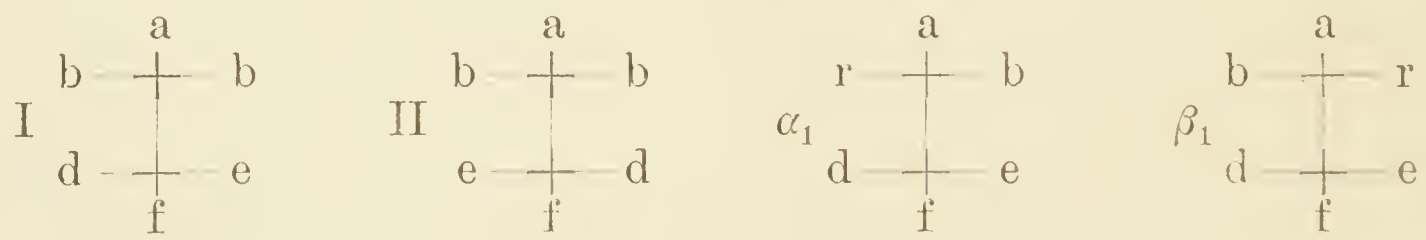
α- und β-Methylglukosid.

Weitere Fälle, in welchen Enzyme stereoisomere Verbindungen mit sehr ungleicher Geschwindigkeit spalten, haben die Polypeptiduntersuchungen Fischers und Abderhaldens geliefert. Es werden

Gespalten	Nicht gespalten
d-Alanyl-d-alanin	d-Alanyl-l-alanin
d-Alanyl-l-leucin	l-Alanyl-d-alanin
l-Leucyl-l-leucin	l-Leucyl-glycin
l-Leucyl-d-glutaminsäure	l-Leucyl-d-leucin
	d-Leucyl-l-leucin.

Seit der Aufstellung der Hypothese, dass Enzyme als optisch aktive Katalysatoren wirken, sind durch eine Reihe interessanter Untersuchungen zahlreiche enzymatische, asymmetrische Synthesen und Spaltungen bekannt geworden.

Asymmetrische Synthese. Entsteht aus einem symmetrischen Molekül ein asymmetrisches, so bilden sich die Rechts- und Linksform in denselben Mengen, so dass man ein inaktives, racemisches Präparat erhält. Wesentlich anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn man ein bereits asymmetrisches Molekül als Ausgangsmaterial für weitere Synthesen benützt. Ersetzen wir z. B. in einem der folgenden Antipoden, etwa in I



den Substituenten b mit einem anderen Radikal r, so können sich dabei zwei neue Formen bilden, nämlich α_1 und β_1. Da in diesen beiden Formen die neu eintretende Gruppe r von den übrigen Bestandteilen des Moleküls verschiedenen Abstand hat, wird es einleuchtend, dass die Bildung der Moleküle α_1 und β_1 mit verschiedener Geschwindigkeit erfolgt.

Ebenso wie aus der Konfiguration I zwei diastereomere[1]), asymmetrische Produkte α_1 und β_1 entstehen, so bilden sich aus II, dem Spiegelbild von I, zwei entsprechende Diastereomere α_2 und β_2, welche ihrerseits Spiegelbilder von α_1 und β_1 sind. Man erhält also aus der Raumform I + II die beiden optischen Paare $\alpha_1 + \alpha_2$ und $\beta_1 + \beta_2$ in verschiedenen Mengen.

Als Beispiel einer asymmetrischen Synthese, wie sie analog auch im lebenden Organismus vorkommen kann, sei folgender von Marckwald untersuchte Fall angeführt:

Methyläthylmalonsäure wurde in ein saures Salz R.H.M. übergeführt:

$$\begin{array}{ccc} CO_2H & CO_2M & CO_2M \\ | & | & | \\ CH_3 . C . C_2H_5 & \alpha\ CH_3 . C . C_2H_5 & \beta\ C_2H_5 . C . CH_3 \\ | & | & | \\ CO_2H & CO_2H & CO_2H \end{array}$$

Die beiden Formen α und β besitzen als optische Antipoden übereinstimmende Eigenschaften, abgesehen vom Sinne der Drehung. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass M selbst optisch inaktiv ist. Wenn dagegen M selbst ein optisch aktives Radikal darstellt, wie z. B. bei der Bildung des sauren Brucinsalzes der Säure, so sind die beiden Formen α und β nicht mehr Spiegelbilder, sondern Diastereomere und müssen sich in physikalisch-chemischer Hinsicht ungleich verhalten. Erhitzt man das Gemisch der α- und β-Formen, um das noch freie Carboxyl abzuspalten, so müssen bei dieser Reaktion die Rechts- und Linksform des Salzes in verschiedenen Mengen entstehen. Die freien Valeriansäuren, welche man erhält, wenn man jetzt den Brucinrest entfernt, bilden ein optisch aktives Gemisch. Nach Fischers Ausdruck hat hier ein aktives Molekül (Brucin) „ein zweites geboren".

Eine Reihe von interessanten Synthesen verdankt man ferner Mc Kenzie (J. Chem. Soc. **85**), welcher durch Reduktion von Benzoylameisensäure-l-menthylester mit Aluminiumamalgam ein Gemisch von d-Mandelsäure-l-menthylester mit einem geringen Überschuss von l-Mandelsäure-l-menthylester erhielt.

Bald darauf konnte er durch Reduktion des Brenztraubensäure-l-menthylesters linksdrehende Milchsäure darstellen (J. Chem. Soc. **87**). Mit Hilfe der Grignardschen Reaktion gelangen weitere asymmetrische Synthesen wie die der linksdrehenden Atrolactinsäure aus Menthylbenzoylformiat und Magnesiummenthyljodid. Mc Kenzie und Wren stellten die optisch aktiven Weinsäuren durch Oxydation der d- und l-Bornyl- und Menthylfumarsäureester dar (Journ. Chem. Soc. **91**).

[1]) Man bezeichnet solche stereoisomere Verbindungen, welche im Verhältnis von Bild zu Spiegelbild stehen, als optisch isomere oder enantiostereoisomere. Dagegen nennt man solche stereoisomere Verbindungen, welche nicht Spiegelbilder sind, diastereoisomere oder diastereomere.

Besonders erwähnt seien von den einschlägigen Untersuchungen diejenigen von Dakin. Nachdem W. Marckwald und A. Mc Kenzie der Nachweis gelungen war, dass die Esterbildungsgeschwindigkeit zweier entgegengesetzt optisch aktiven Säuren gegenüber einem und demselben optisch aktiven Alkohol nicht die gleiche ist (Chem. Ber. **32**, 2130; 1899 und **34**, 469: 1901), hat Dakin (Journ. of Physiol. **30**) gefunden, dass inaktiver Mandelsäurementhylester bei der partiellen Hydrolyse durch Lipase eine stark rechtsdrehende Mandelsäure liefert, während der zurückbleibende Ester entsprechend linksdrehend war, dass also die Rechts-Komponente des Esters rascher hydrolysiert wurde als die Links-Komponente [1]). Daran hat dieser Forscher eine Reihe interessanter Schlüsse und weitere Versuche geknüpft (Journ. of Physiol. **32**). Zunächst wird daran erinnert, dass zwei optische Antipoden, welche sich mit derselben asymmetrischen Substanz verbinden, dies mit ungleicher Geschwindigkeit tun, und dass andererseits die Produkte einer derartigen Reaktion sich mit verschiedener Geschwindigkeit zersetzen. Dieser Fall liegt nach Dakin bei der asymmetrischen Esterhydrolyse durch Lipase vor: Lipase muss also selbst eine optisch aktive Substanz sein, welche mit dem Ester, welchen sie spaltet, eine Verbindung eingeht. Versuche ergaben ferner, dass bei der fraktionierten Hydrolyse einer Serie von strukturell verwandten racemischen Estern, die am schnellsten angegriffenen Komponenten stets ähnliche Konfiguration, aber nicht notwendig gleiche Drehungsrichtung besitzen.

Eine asymmetrische Spaltung durch Lipase wurde ebenfalls erzielt, wenn nicht der Säure-, sondern der Alkoholrest des Esters ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besass. Dakin zieht hieraus den Schluss, dass die Verbindung zwischen dem Enzym und dem Ester nicht ausschliesslich an der Säuregruppe erfolgt, sondern wahrscheinlich das Estermolekül als ganzes gebunden wird.

Endlich sei an eine Reihe zum Teil schon älterer, mehr gelegentlicher Beobachtungen, sowie an neuere Versuche von A. Mc Kenzie und A. Harden (Proc. Chem. Soc. **19**, 48; 1903), erinnert, welche zeigen, dass die Spezifität von Mikroorganismen optischen Antipoden gegenüber doch nicht vollständig ist. Auch die als Nahrung minder bevorzugte Antipode wird von Mikroorganismen, wenn auch erheblich langsamer und unvollständiger, verbraucht, und selbst in zellfreien (kräftig wirkenden) Enzymlösungen scheint, in gewissen Fällen wenigstens, keine der beiden Formen ganz unangegriffen zu bleiben. Auch hier versprechen quantitative Messungen über die relative Angreifbarkeit der Spiegelbilder wertvolle Resultate.

Während es sich bei den Versuchen von Dakin durchwegs um asymmetrische Spaltungen handelt, beschrieb vor kurzer Zeit Rosenthaler

[1]) Praktische Anwendung hat die racemische Ester-Hydrolyse auch zur Darstellung optisch aktiver Aminosäuren gefunden (Warburg).

(Biochem. Z. **14**) eine wirkliche asymmetrische Synthese, nämlich die Bildung von d-Benzaldehydcyanhydrin aus Benzaldehyd und Blausäure unter der Einwirkung von Emulsin. Von seinen Versuchen sei z. B. folgender erwähnt:

5 g Emulsin wurden mit 20 ccm Wasser angerieben, dann 0,675 g Blausäure hinzugesetzt und nach einer Stunde 20 g Benzaldehyd unter ständigem Schütteln dazu getröpfelt, worauf die Flüssigkeit im Schüttelapparat noch 1 Stunde bewegt wurde. Das in üblicher Weise isolierte Nitril wurde verseift, die wässerige Lösung der Mandelsäure wurde ausgeäthert. Der aus Benzol umkrystallisierte Rückstand zeigte eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = -153{,}78$, in sehr naher Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur.

Wie Rosenthaler dann neuerdings fand, ist im Emulsin teils eine Substanz wirksam, welche den asymmetrischen Verlauf der Synthese bedingt, und teils ein Bestandteil, welcher die Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone überhaupt beschleunigt. Letzterer Stoff hat sich als Verbindung des Magnesiums, Calciums oder Kaliums erwiesen. Zum Verständnis dieser Erscheinung dürfte die neuerdings erschienene Untersuchung von Franzen (Chem. Ber. **42**, 3293; 1909) führen, welcher nachwies, dass Aldehyde und Ketone mit Calcium-, Baryum-, Strontium- und Magnesiumcyanid zur Bildung der Calcium-, Baryum-, Strontium- und Magnesiumsalze der entsprechenden Nitrile Veranlassung geben. Die Reaktion verläuft in folgender Art:

$$2\ C_6H_5 . C\begin{matrix}\diagup\!\!\!\!\diagup O \\ \diagdown H\end{matrix} + Ca(CN)_2 = C_6H_5 . CH\begin{matrix}\diagup O . Ca . O \diagdown \\ \diagdown CN \quad CN \diagup\end{matrix}CH . C_6H_5.$$

Einen sehr interessanten, dem obigen nahestehenden Fall haben Bredig und Fajans beschrieben (Chem. Ber. **41**, 752; 1908). Die beiden optisch aktiven Camphocarbonsäuren, welche beim Erhitzen leicht in Campher und Kohlensäure zerfallen, spalten sich nach der Gleichung

$$C_{10}H_{15}O . CO_2H = C_{10}H_{16}O + CO_2$$

mit verschiedener Geschwindigkeit, wenn sie sich in reinem Nikotin oder in einem nikotinhaltigen Lösungsmittel befinden. Es sei folgende Tabelle angeführt:

Geschwindigkeit der Kohlensäureabspaltung in Nikotin bei 70°

für 1 g d-Säure	k_d	für 1 g l-Säure	k_l
gelöst in 3 ccm Nikotin	0,00493	gelöst in 5 ccm Nikotin	0,00436
„ „ 5 ccm „	0,00493	„ „ 5 ccm „	0,00444
„ „ 10 ccm „	0,00479	„ „ 10 ccm „	0,00421
Mittel	0,00488	Mittel	0,00434

Die d-Säure zersetzt sich also im Nikotin als Lösungsmittel um ca. 13% schneller als die l-Säure. Offenbar haben wir wie im obigen Fall eine Salzbildung zwischen der aktiven Säure und der aktiven Base, so dass diastereomere Körper entstehen, welche sich in ihrem chemischen Verhalten unterscheiden.

In dem von Bredig studierten Fall entweicht die abgespaltene Kohlensäure, so dass das vorher an die Camphocarbonsäuren gebundene Nikotin

nach der Spaltung wieder frei wird und mit neuen Mengen Säure zur Salzbildung zusammentreten kann.

Der Unterschied zwischen der Anordnung von Marckwald und der von Bredig liegt also darin, dass letzterer eine schwächere Base zur Anwendung brachte. Dadurch gewinnt die von Bredig studierte Reaktion den Charakter eines katalytischen Vorgangs.

Jedenfalls geben die Versuche von Marckwald und von Bredig gute Stützen für die von Fischer zuerst geäusserte Auffassung, dass die Enzyme optisch aktive Katalysatoren sind. Ihre Wirkungsweise kann offenbar so beschrieben werden:

Durch Vereinigung mit dem racemischen Substrat geben die optisch aktiven Enzyme Anlass zur Bildung von diastereomeren Körpern, welche mit verschiedener Geschwindigkeit zerfallen, und so Anlass zur Entstehung optisch aktiven Materials geben.

E. Fischer hat den interessanten Versuch gemacht, ob nicht zwei optisch entgegengesetzt aktive Säuren, d- und l-Kampfersäure, Rohrzucker mit verschiedener Geschwindigkeit spalten. Das Resultat war negativ. Indessen ladet die Wahrscheinlichkeit der Voraussetzung, dass sich katalysierende Säuren, analog wie Enzyme mit dem Substrat verbinden, zur Weiterführung dieser Versuche ein, sowie zur Umkehrung, zwei Spiegelbilder als Substrat durch einen optisch aktiven Katalysator spalten zu lassen. Mit derartigen Versuchen ist auch der Verf. seit mehreren Jahren beschäftigt. Offenbar sind alle Tatsachen wertvoll, welche uns die nähere Kenntnis der Bindung zwischen Enzym und Substrat vermitteln.

Durch das Bild von dem zum Schloss passenden Schlüssel, also durch die Hypothese, dass die Enzyme optisch aktive Katalysatoren sind, werden die Enzyme enger mit den übrigen Katalysatoren verknüpft. Der Ausbau dieser Hypothese ist zweifellos eines der wichtigsten Ziele der Chemie der Enzyme.

Schluss.

Welche Ergebnisse der Enzymforschung haben wir nun hier verzeichnen können?

Was zunächst die chemische Natur der Enzyme betrifft, so ist das Ergebnis unserer Übersicht nur ein negatives, insofern wir aus den vorliegenden Analysen der verschiedenen Enzympräparate und aus ihren chemischen Reaktionen nur feststellen können, dass für die in der Literatur [1]) oft vertretene Annahme, die Enzyme seien Eiweisskörper, keine Anhaltspunkte vorliegen; auch spricht nichts dafür, dass alle Enzyme einer einzigen Körperklasse angehören. Andererseits existiert keine Tatsache, welche bestimmt den Eiweisscharakter irgend eines der hydrolysierenden Enzyme ausschlösse, denn die Angaben über die ausgebliebenen Eiweissreaktionen von Enzymlösungen sind nicht von Konzentrationsangaben und genügenden Parallelversuchen mit ebenso verdünnten Lösungen unzweifelhafter Eiweisskörper begleitet. Alles was sonst über die chemische Zusammensetzung der Enzyme gesagt werden könnte, gehört ins Bereich der Vermutungen. Eher als aus den rein chemischen Untersuchungen könnten wir aus den physikalisch-chemischen Messungen über Wärmeempfindlichkeit, also aus den Inaktivierungskonstanten gewisse Beziehungen zu den Proteinen zu entnehmen versuchen, deren Wärmedenaturierung wirklich an die der Enzyme erinnert. Noch ausgesprochenere

---

[1]) Die ältere Literatur über die chemische Natur der Fermente habe ich hier kaum erwähnt. Man findet sie teilweise in einer Arbeit von H. Friedenthal (Engelmanns Arch. f. Physiol. **24**, 181; 1900), welcher den Standpunkt vertritt, dass die Fermente Nukleoproteide sind oder noch komplizierter zusammengesetzte Körper. Eine Tabelle über ältere Analysen von Fermentpräparaten sei hier nach v. Moraczewski mitgeteilt:

C	H	N	Asche		
43,6	6,7	14,0	0,88	Trypsin	Hüfner
48,8	7,13	14,16	1,2	Emulsin	A. Schmitt
43,9	8,4	6,0	0,6	Invertin	Barth
46,6	7,3	10,4	1,0	Diastase	Litner
46,6	7,1	14,9	0,9	Pankreatin	—
43,9	6,9	9,5	0,6	Invertin	Donath
43,5	7,0	11,6	1,3	Emulsin	Bull

Analogien weisen aber vielleicht die Saponine auf diese merkwürdigen kolloiden Giftstoffe, deren physikalisch-chemisches Verhalten leider noch zu wenig untersucht ist.

Die Einsicht, dass gewisse Enzyme zur Entfaltung ihrer Wirksamkeit dem Substrat gegenüber noch anderer Stoffe bedürfen, Ko-Enzyme, Säuren usw., Stoffe, die wir als Aktivatoren zusammenfassen, hat veranlasst, dass man jetzt den Chemismus der Enzymwirkung einer eingehenden qualitativen Untersuchung unterwirft, und die Berücksichtigung dieser Aktivatoren ist ihrerseits für das chemisch-dynamische Studium der Enzyme von grösster Bedeutung.

Die vielen Abweichungen gerade der klassischen Enzyme wie z. B. der Invertase von den einfachen Beziehungen, welche das Massenwirkungsgesetz fordert, hatten zu einer formellen Behandlung der Enzymreaktionen geführt, deren Resultate keineswegs der aufgewandten Arbeit entsprach. Erst in der allerletzten Zeit ist dann die notwendige Revision der früheren Versuche begonnen worden, aber trotzdem dürfte nicht verfrüht sein zu behaupten, dass die Reaktionen, welche durch Enzyme ausgelöst werden — es seien dabei speziell die enzymatischen Hydrolysen ins Auge gefasst — nach denselben Gesetzen verlaufen, welche im allgemeinen für katalytische Reaktionen in Lösung gelten, und welche sich theoretisch aus dem Massenwirkungsgesetz herleiten lassen. Wir fanden vielfach das Zeitgesetz für monomolekulare Reaktionen und Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit. Wo dies nicht zutrifft, kennen wir entweder mit Sicherheit den störenden Einfluss der Reaktionsprodukte, oder wir haben allen Anlass, einen solchen zu vermuten. In welcher Weise diese Störung zustande kommt, ist im einzelnen noch unklar, zuweilen dürften es die Enzyme selbst sein, welche gebunden werden, oft aber Aktivatoren; letzterer Fall scheint dem Verf. der häufiger vorkommende zu sein. Jedenfalls findet man, wie wir gesehen haben, auch für die Schützsche Regel eine einfache Deutung; ähnliche Beziehungen wie die von Schütz können auch durch anorganische Katalysatoren hervorgerufen werden, und damit fällt eines der bekanntesten scheinbaren Eigentümlichkeiten enzymatischer Reaktionen. Denn dass den zahlreichen „Gesetzen“ wie $k = \frac{1}{t} \log \frac{a + x}{a - x}$ und anderen weder eine reelle Bedeutung noch Gültigkeit zukommt, kann als eine feststehende und erfreuliche Tatsache betrachtet werden.

Die Enzyme sind also Katalysatoren. Lassen sie, wie die anorganischen Katalysatoren der bestbekannten Reaktionen, etwa der Esterhydrolyse, das Gleichgewicht der Reaktion unverändert? Vielleicht unter gewissen Umständen und öfter als es jetzt der Fall zu sein scheint, aber — das können wir wohl behaupten — nicht immer, und wir müssen deshalb den Begriff Katalysator etwas weiter fassen, als man dies auf Grund der Erfahrungen

an nicht enzymatischen Reaktionen getan hat. Mit den Grundlagen der chemischen Dynamik bezw. mit den Hauptsätzen der Thermodynamik kommen wir deswegen aber keineswegs in Widerspruch, nur müssen wir annehmen, dass sich ein einigermassen erheblicher Anteil des Enzyms mit dem Substrat bezw. mit dem Reaktionsprodukt verbinden kann. Von der Konzentration dieser neuen Molekülarten, Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukt muss offenbar das Gleichgewicht abhängen, und alle Umstände, welche diese Konzentrationen ändern, ändern auch das Gleichgewicht bezw. den Endzustand der Reaktion.

Die Konfiguration des Substrates, die räumliche Anordnung seiner Atome ist, wie wir im vorhergehenden Kapitel gesehen haben, von ausschlaggebender Bedeutung für das Eintreten einer Enzymreaktion. Emil Fischer hat uns für diese Tatsachen die Theorie gegeben. Ihr liegt die Annahme zugrunde, dass ein Enzym ein optisch aktiver Katalysator ist. Derselbe bildet „aktive Moleküle“ mit den beiden Komponenten eines racemischen Substrates; dabei entstehen aber keine Spiegelbilder, sondern diastereomere Produkte, welche sich durch ihre chemischen Eigenschaften unterscheiden und somit auch mit ungleicher Geschwindigkeit den Zerfall der einen Komponente herbeiführen. Was also früher die Katalysatoren der lebenden Wesen zu charakterisieren schien, erweist sich im Lichte dieser Theorie als eine Konsequenz unserer Anschauung über die Konfiguration der Moleküle.

Welcher Art aber ist die Bindung, welche zwischen dem Enzym und dem Stoff eintritt, welcher dem chemischen Angriff unterliegt? Und wie hält der lebende Organismus das für sein Bestehen so wichtige Gleichgewicht zwischen Enzym und Substrat? Hier liegt das grosse Rätsel über die Bildung der Enzyme und Antienzyme im Organismus, und wir blicken in ein Forschungsgebiet von unübersehbarer Weite.

Anhang.

Arbeitsmethoden.

Im Folgenden sind kurz solche Methoden zur Untersuchung von Enzympräparaten und zur Verfolgung enzymatischer Spaltungen erwähnt, welche eine allgemeine Anwendung, sei es in der ärztlichen Praxis, sei es in der Technik, gefunden haben oder finden können.

Für die wissenschaftliche Untersuchung enzymatischer Reaktionen haben sich neuerdings oft physikalisch-chemische Methoden bewährt. Die eingehende Beschreibung derselben würde hier zu viel Raum beanspruchen, und es muss also auf die einschlägige Spezialliteratur verwiesen werden. Besonders genannt seien:

Ostwald-Luther, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physikalisch-chemischer Messungen; 2. Aufl. Leipzig. 1902.

W. A. Roth, Physikalisch-chemische Übungen. Hamburg. 1907.

Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre. Wiesbaden. 1902/04.

Ferner kürzere Referate von

A. Kanitz in Oppenheimers Handbuch. Bd. 1. 26; 1908.

G. Bredig, „Physikalische Chemie und Elektromedizin“ im „Handbuch der ges. medizinischen Anwendungen der Elektrizität“. Leipzig. 1909.

Was zunächst die Methoden zur Gewinnung der Enzyme angeht, so sind dieselben bereits im ersten Kapitel dieses Buches angegeben worden, woselbst auch die Reindarstellung der einzelnen Enzyme besprochen ist.

Es braucht also nur allgemein daran erinnert zu werden, dass man Enzyme, welche innerhalb einer Zellwand wirksam sind, oft nicht oder nur sehr unvollständig extrahieren kann, solange die Zellwand lebend und unbeschädigt ist; viel leichter gestattet die getötete Zellwand den Durchtritt. Man hat dann mehrere Mittel, zum Enzym zu gelangen.

1. Man trocknet das enzymhaltige Material, und zwar möglichst schnell und bei möglichst niedriger Temperatur. Die Zellwände werden dann teils durchlässiger und teils leichter zerreissbar; dieser Effekt wird noch erhöht,

wenn man die entwässerten Zellen auf etwa 50—70° erhitzt. (Vergl. die Methode von E. Fischer zur Darstellung der Invertase (Chem. Ber. **27**) und die Methode von Wiechowski und Wiener (Hofm. Beitr. **9**) zur Darstellung des Harnsäure oxydierenden Enzyms aus der Niere.

2. Man trägt das gut zerkleinerte, mechanisch von Wasser befreite Material, z. B. Hefezellen, in absoluten Alkohol oder wasserfreies Aceton ein. Auch hier ist darauf zu sehen, dass die Entwässerung durch das organische Lösungsmittel möglichst schnell geschieht.

3. Man bewirkt die Zerstörung der Zellwände durch Autolyse (vergl. die Methode von O'Sullivan und Tompson, S. 22).

4. Man zerreisst die noch lebenden Zellen mechanisch. Sehr bekannt sind ja die erfolgreichen Versuche von Buchner (vergl. S. 38). Eine etwas andere Methode hat Rowland (Journ. of Physiol. **27**) angegeben, bei welcher eine Mischung der Zellen mit Sand in stark rotierende Bewegung versetzt wird. Die Wirkung erinnert an diejenige des Sandstrahlgebläses.

Bakterien, weiche Organe usw. kann man durch Abkühlung in flüssiger Luft erhärten und dadurch leichter mechanisch zerreissbar machen.

Wir wenden uns nun zu den analytischen Methoden.

Lipasen. Pankreaslipase wird sehr geeignet an einer wässerigen Emulsion von Eigelb geprüft, wie dies in den Arbeiten von Volhard u. a. geschehen ist. Man bestimmt die Menge des zur Zeit t gespaltenen Fettes und hierauf die Gesamtmenge des überhaupt spaltbaren Fettes.

Zu diesem Zweck extrahiert man die lipasehaltige Eigelbemulsion mit Äther. I. Man titriert einen aliquoten Teil (50 ccm) des Ätherextraktes nach Zusatz von 50 ccm Alkohol, verseift mit 10 ccm n-NaOH und zerlegt die fettsauren Salze nach 24 Stunden durch 10 ccm n-H_2SO_4. II. Man titriert zur Ermittelung der durch Verseifung gewonnenen Fettsäuren und berechnet die durch das Enzym abgespaltenen Prozente Fettsäure nach der Formel $I : I + II = x : 100$.

Beim Ausschütteln der Fettemulsion mit Äther werden zweckmässig behufs rascherer Schichtung 2—10 ccm Alkohol zugefügt.

Vergl. Stade, Hofm. Beitr. **3**, 291; 1902 und Engel, Hofm. Beitr. **7**, 78; 1905.

Esterasen niederer Ester. Als Substrat kommt am besten Äthylbutyrat zur Anwendung. Der Verlauf der Reaktion wird direkt titrimetrisch gemessen, eventuell durch Verfolgung der Änderung der elektrischen Leitfähigkeit.

Pflanzliche Lipasen. Ricinussamen werden geschält, durch Auspressen und Behandeln des Presskuchens mit Äther von Öl befreit und fein gemahlen. Die gebildete Samenmilch wird in einer Zentrifuge von den unwirksamen Bestandteilen des Samens getrennt. Man lässt sie 24 Stunden stehen, unterdessen sammelt sich die enzymhaltige Emulsion, in welcher sich

die zur Aktivierung nötige Säure (Milchsäure) bildet, an der Oberfläche an und kann abgehoben werden. Mit 5—10 g dieser Emulsion verrührt man 100 g Öl und 0,2 g Manganosulfat und überlässt die Mischung sich selbst. Auch hier kann die Lipolyse direkt durch Titration verfolgt werden.

Amylasen. Zur brauereitechnischen Bestimmung der diastatischen Kraft von Malz gibt Lintner folgende Anweisung (Z. prakt. Chem. **34**, 386; 1886), welche kürzlich nach Versuchen von Chr. Wirth (Ztschr. f. ges. Brauwesen **31**, 421; Chem. Zbl. 1908, II, 1384) modifiziert wurde.

Man bereitet einen Malzauszug durch sechsstündige Extraktion von 25 g Malzschrot mit 500 ccm Wasser bei gewöhnlicher Temperatur. Von dem klar filtrierten Extrakt werden bei Grünmalz 2, bei hellem Malz 4 und bei dunklem 8 ccm zu 100 ccm einer 2%igen, neutralen Stärkelösung in einem 150 ccm-Kolben zugegeben und $^1/_2$ Stunde bei 20° stehen gelassen. Dann werden 10 ccm 0,10 norm. NaOH zugesetzt, der Kolben wird mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt; die Maltose wird hierauf durch einen titrimetrischen Vorversuch mit Fehlingscher Lösung und schliesslich nach einer der üblichen Reduktionsmethoden, z. B. nach Soxleth, Allihn oder Bertrand bestimmt. Die Tabellen von Wein sollen keine zuverlässigen Werte liefern.

Für Enzympräparate gibt Lintner folgende Vorschrift:

0,2 bis 0,5 g Diastase (je nach der Stärke des Präparates) werden in 50 ccm Wasser gelöst und davon in eine Reihe von 10 Reagenzröhren, welche 10 ccm 2%iger Stärke enthalten, je 0,1, 0,2 usw. bis 1,0 ccm gegeben. Man sorgt für vollständige Mischung und lässt die Röhren 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Dann versetzt man mit 5 ccm Fehlingscher Lösung, kocht die Röhren gleichzeitig im Wasserbad und ermittelt, in welcher Röhre eben alles Kupferoxyd reduziert ist. In einer zweiten Versuchsreihe kann man die Konzentrationsgrenzen noch enger wählen. Die Wirksamkeit eines Präparates drückt man aus, indem man denjenigen diastatischen Effekt gleich 100 setzt, bei welchem 0,3 ccm einer Lösung von 0,1 g in 250 ccm Wasser aus 10 ccm einer 2%igen Stärkelösung unter obigen Bedingungen so viel Zucker bilden, dass 5 ccm Fehlingscher Lösung gerade reduziert werden.

Eine lösliche Stärke mit reproduzierbaren Eigenschaften erhält man, wenn man Kartoffelstärke mit 7,5%iger Salzsäure überschichtet, sieben Tage stehen lässt, die Salzsäure hierauf mit kaltem Wasser auswäscht und die Stärke an der Luft trocknet. Man erhält dann ein in heissem Wasser leicht und klar lösliches Produkt.

Das diastatische Vermögen wird ausgedrückt in g Maltose, welche durch 100 g Malz geliefert werden.

Die Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit durch die Oxydation der Flüssigkeit mit Fehlingscher Lösung (vergl. auch Wroblewski, H. **24**)

ist wohl die zuverlässigste der bis jetzt ausgearbeiteten Methoden; sie wäre allerdings auch wohl noch der Verbesserung fähig.

Eine Reihe anderer Methoden gründet sich auf die Färbungen, welche Jod in Stärke- und Dextrinlösungen hervorruft. Neben den älteren Vorschriften von Detmer (H. 7), Roberts u. a. ist hier besonders die folgende Methode von Wohlgemuth (Biochem. Z. 9) zu erwähnen.

Man beschickt eine Reihe Reagensgläser mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Enzymlösung, fügt zu jedem Röhrchen 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung und stellt sofort jedes Röhrchen in ein Gefäss mit Eiswasser, in dem sich ein Drahtkorb zur Aufnahme der Gläschen befindet. Die Anwendung des Eiswassers hat den Zweck, jede Enzymwirkung zunächst vollständig auszuschliessen. Wenn dann alle Gläschen in dieser Weise vorbereitet sind, wird der Drahtkorb mit sämtlichen Gläschen in ein Wasserbad von 40° übertragen; dadurch wird erreicht, dass die Wirkung des Enzyms in allen Portionen zu genau dem gleichen Zeitpunkt einsetzt. Bei dieser Temperatur bleibt der Drahtkorb 30 bis 60 Minuten, je nachdem man den Versuch ausdehnen will, und wird nach Ablauf der entsprechenden Frist wieder in das Gefäss mit Eiswasser übertragen und kurze Zeit darin belassen; auf diese Weise wird die Enzymwirkung wiederum in sämtlichen Portionen zu genau der gleichen Zeit unterbrochen. Damit ist die eigentliche Ausführung des Versuchs beendet.

Um nun die Stärke der Enzymlösung festzustellen, wird folgendermaassen verfahren:

Sämtliche Reagensgläschen werden etwa bis fingerbreit vom Rande mit Wasser aufgefüllt, zu jedem Gläschen je ein Tropfen einer $^{n}/_{10}$-Jodlösung zugesetzt und umgeschüttelt. Dabei beobachtet man verschiedene Färbungen, wie dunkelblau, blauviolett, rotgelb und gelb. Diejenigen Gläschen, die eine gelbe bis rotgelbe Farbe aufweisen, enthalten — wenn wir von einem weiteren Abbau der Stärke zu Maltose resp. Isomaltose und Traubenzucker absehen — nur noch Achroodextrin resp. Erythrodextrin, die blauviolett gefärbten enthalten ein Gemisch von Erythrodextrin einerseits und Stärke andererseits, und endlich die mit einer dunkelblauen Färbung vorwiegend unveränderte Stärke. Als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) bezeichnet Wohlgemuth dasjenige Gläschen, in dem zum ersten Male die blaue Farbe unverkennbar auftritt, das ist also dasjenige Gläschen, das die violette Farbe zeigt. Danach ist in dem vorhergehenden Gläschen sämtliche Stärke mindestens zum Dextrin abgebaut. Aus ihm berechnet sich die Enzymmenge in der Weise, dass die Anzahl Kubikcentimeter einer 1%igen Stärkelösung bestimmt wird, die durch 1,0 ccm der Enzymlösung in der für den Versuch angewandten Zeit biszum Dextrin total abgebaut wird.

Das eben farblos gewordene Gläschen enthalte beispielsweise 0,02 ccm Speichel; es wären dann 0,02 ccm Speichel imstande, innerhalb 30 Minuten

5 ccm 1%iger Stärkelösung in Dextrin umzuwandeln, mithin 1,0 ccm Speichel = 250 ccm 1%ige Stärkelösung. Die diastatische Kraft für 1 ccm der Enzymlösung bezeichnet Wohlgemuth in der Abkürzung des Wortes Diastase mit D und schlägt vor, bei jedem Versuch gleichzeitig Temperatur und Zeit anzugeben, mit denen gearbeitet wurde. Für das hier gewählte Beispiel würde sich also ergeben $D\frac{40^0}{30'} = 250$. Berechnen wir den diastatischen Wert aus einem Versuch, bei dem das Gläschen Nr. 5 als untere Grenze angenommen wird und bei dem das Gläschen Nr. 4, das 0,0125 ccm Speichel enthält, rot gefärbt sei (vergl. die l. c. gegebene Farbenskala), so haben wir folgende rechnerische Überlegung zu machen:

0,0125 ccm bauen in 30′ = 5 ccm 1%ige Stärkelösung ab
1,0000 „ „ „ 30′ = 400 ccm 1%ige „ „

Mithin $D\frac{40^0}{30'} = 400$.

Glinski und Walther (Pawlow, Arb. d. Verdauungsdrüsen; Wiesbaden 1898) haben die Mettsche Methode auch zur Diastasebestimmung angewandt. Enge, beiderseits offene Glasröhrchen werden mit Stärkekleister gefüllt und in die enzymhaltige Flüssigkeit gelegt. Nach einer gewissen Zeit misst man die Länge des gelösten Stärkezylinders. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird offenbar stark durch die Diffusion des Enzyms zum Querschnitt des Stärkezylinders beeinflusst und von der Geschwindigkeit, mit welcher die Reaktionsprodukte sich von der Oberfläche entfernen; die Bewegung der Flüssigkeit, bezw. der Röhren in der Flüssigkeit ist deswegen offenbar von grösstem Einfluss. Andererseits wird mit der genannten Anordnung die Verflüssigung des Stärkekleisters gemessen, die kein direktes Maass für die verzuckernde Wirkung der Amylase ist. Die Methode wird also nur in speziellen Fällen zur Anwendung gelangen können.

Gewisse Vorzüge scheinen nach Ed. Müller (Zbl. f. inn. Med. 1908) Stärkekleisterplatten zu besitzen.

Die Enzyme der Disaccharide und Glukoside. Man hat hier in der Beobachtung der Änderung des optischen Drehungsvermögens eine ebenso einfache wie genaue Methode, den Fortschritt der Reaktion zu verfolgen. Wesentlich ist, worauf bereits S. 114 hingewiesen wurde, den Einfluss der Multirotation der Glukose auszuschalten. Es geschieht dies am besten durch Zusatz von Soda unmittelbar vor der Beobachtung.

Als weitere Methode kommt auch hier die Bestimmung des Reduktionsvermögens der Lösung in Betracht; dasselbe nimmt bei der Spaltung der Biosen um etwa das doppelte zu. Es geschieht durchweg mittels der Fehlingschen Lösung nach verschiedenen Methoden, von welchen diejenige von Bertrand eine der genauesten und bequemsten ist.

Bertrand (Bull. Soc. Chim. **35**, 1285; 1906) lässt die zu untersuchende Zuckerlösung mit einer Fehlingschen Lösung von bestimmtem Gehalt 3 Minuten lang kochen, von dem Augenblick an gerechnet, wo sich die ersten Blasen bilden. Der Kupferoxydulniederschlag wird auf einem Asbestfilter abfiltriert und mit heissem Wasser abgewaschen. Der im Erlenmeyer-Kolben zurückgebliebene Cu_2O-Niederschlag, wie auch der auf dem Asbestfilter zurückgebliebene, werden in einer Lösung von $Fe_2(SO_4)_3$ in H_2SO_4 gelöst, wobei sich die beiden Verbindungen nach folgender Formel umsetzen:

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 = 2\,CuSO_4 + H_2O + 2\,FeSO_4.$$

Das entstandene Ferrosalz titriert man mit einer $KMnO_4$-Lösung, welche auf Ammoniumoxalat eingestellt wird. Bertrand hat Tabellen für die wichtigsten Zuckerarten ausgearbeitet, nach welchen man aus der gebildeten Cu_2O-Menge den Zuckergehalt leicht ermitteln kann.

Die erforderlichen Lösungen werden mit folgenden Mengen hergestellt, welche in destilliertem Wasser zu je einem Liter gelöst werden.

Fehlings Lösung.	
Kupfersulfat	40 g
Seignettesalz	200 g
Natriumhydroxyd	150 g

Eisenlösung.	
Ferrisulfat	50 g
Schwefelsäure	200 g

Permanganatlösung.	
Kaliumpermanganat	5 g

Die Eisenlösung darf die Permanganatlösung nicht reduzieren. Man überzeugt sich hiervon, indem man vorsichtig etwas von der oxydierenden Flüssigkeit zusetzt: einige Tropfen sollen schon eine leichte Farbenänderung hervorrufen. Ist dies nicht der Fall, so setzt man Permanganat zu bis dieses Resultat erreicht ist; die Eisenlösung ist dann zum Gebrauch fertig.

Will man eine zuckerhaltige Flüssigkeit titrieren, so gibt man in einen Erlenmeyerkolben von etwa 125—150 ccm Inhalt 20 ccm der Zuckerlösung. Diese 20 ccm dürfen bis 100 mg reduzierenden Zuckers enthalten; günstiger ist aber eine geringere Quantität von etwa 10—90 mg.

Man fügt zu der Zuckerlösung 20 ccm Kupferlösung und 20 ccm alkalische Seignettesalzlösung und kocht volle 3 Minuten von dem Augenblick an, wo sich Blasen bilden.

Zur Filtration des Cu_2O-Niederschlages bedient man sich eines mit Asbest gefüllten Gooch-Tiegels, welcher in gewöhnlicher Weise über einer Saugflasche zur Anwendung kommt. Beim Abfiltrieren bringt man so wenig Cu_2O auf das Filter wie möglich. Man wäscht nun den im Erlenmeyerkolben befindlichen Hauptteil des Niederschlages mit warmem Wasser und dekantiert durch das Filter. Ist die Auswaschung beendet, so löst man das Kupferoxydul im Erlenmeyerkolben unter Umschütteln mit einer genügenden Menge Ferrisulfatlösung. Der Niederschlag geht unmittelbar von lebhaftem Rot in Schwarzblau über und liefert dann eine klare, schön hellgrüne Lösung. Man giesst dieselbe durch das Filter, um die darin befindliche kleine Cu_2O-Menge aufzulösen; wenn nötig, wendet man zu dieser Lösung noch einige ccm Ferrisulfatlösung an. Ist alles Kupferoxydul gelöst, so wäscht man den Erlenmeyerkolben und das Filter mit destilliertem Wasser und titriert die vereinigten Flüssigkeiten in der Saugflasche mit Permanganat. Der Farbenumschlag von grün in rosa ist dabei ausserordentlich scharf.

Aus der obigen Reaktionsgleichung ersieht man, dass zwei Kupferatome zwei Molekülen Ferrosulfat entsprechen, also zwei durch das Permanganat aufzuoxydierenden Eisenatomen. Man hat also nur den Eisentiter der Permanganatlösung durch das Verhältnis

$$\frac{63{,}6}{55{,}9} = 1{,}1377$$

zu multiplizieren, um den Kupfergehalt zu finden, aus dem man mit Hilfe der Tabellen den Zuckergehalt ermittelt.

Die Einstellung der Permanganatlösung geschieht mit Ammoniumoxalat folgendermaassen: Man wägt etwa 250 mg in ein Becherglas und löst dieselben in 50—100 ccm Wasser und 1—2 ccm reiner Schwefelsäure. Man erhitzt auf 60—80° und lässt die Permanganatlösung zufliessen, bis sich die Rosafärbung hält.

Ein Molekül Ammoniumoxalat $C_2O_4(NH_4)_2 + H_2O$ (Mol.-Gew. 142,1) entspricht 2 Fe und somit 2 Cu.

Multipliziert man das Gewicht des Oxalates durch $\frac{63{,}6 \times 2}{142{,}1} = 0{,}8951$, so erhält man die Menge Kupfer, welche dem zur Rosafärbung erforderlichen Volumen der Permanganatlösung entspricht. Ein Liter Permanganatlösung entspricht ungefähr 10 g Kupfer.

Die Tabellen zur Ermittelung des Zuckergehaltes nach der obigen Methode findet man am Schluss dieses Abschnittes (S. 226—230).

Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker, welche auch zur Verfolgung enzymatischer Prozesse Anwendung finden wird, hat I. Bang (Biochem. Z. **2**) beschrieben. Dieselbe beruht darauf, dass sich Kupferoxydul in Gegenwart von Rhodankalium als weisses, unlösliches Kupferrhodanid ausscheidet. Da die Beschreibung der Methode leicht zugänglich ist, kann hier von der ausführlicheren Wiedergabe abgesehen werden.

Emulsin. Auld hebt in einer Diskussion der möglichen Methoden zur Messung der Amygdalinspaltung hervor, dass die Bestimmung der freigewordenen Zuckermengen manchen Bedenken unterworfen ist. Jedenfalls muss auch hier der Einfluss der Multirotation ausgeschaltet werden. Er verwendet deshalb bei seiner S. 123 erwähnten Untersuchung die von Dunstan und Henry (Proc. Roy. Soc. **72**, 287; 1903) beschriebene titrimetrische Methode zur Ermittelung der freien Blausäure mit einer Jodlösung von bekanntem Gehalt.

Die Reaktion erfolgt nach der Gleichung:

$$HCN + J_2 = CNJ + HJ$$

Überschuss von saurem Natriumkarbonat bindet die entstehende Jodwasserstoffsäure.

Proteolytische Enzyme.

Gemäss der erheblichen Bedeutung, welche Messungen der verdauenden Wirkung für die reine Enzymologie und zugleich für die praktische Medizin besitzen, ist die Zahl der Arbeiten, welche sich mit der diesbezüglichen Methodik beschäftigen, eine sehr grosse.

I. Eine optische Methode hat E. Schütz (vergl. S. 125) zur Anwendung gebracht. Er entfernt aus den pepsinhaltigen Albuminlösungen das unverdaute Eiweiss und bestimmt aus der optischen Drehung der zurückbleibenden Lösung die Menge der gebildeten Peptone.

Ebenso haben Schütz und Huppert gearbeitet (vergl. S. 128) Abderhalden und seine Mitarbeiter (vergl. S. 128) studieren neuerdings die Wirkung tryptischer Enzyme auf optisch aktive Polypeptide durch direkte Messung der Drehungsänderung der Lösung.

Ib. Die Änderung des Brechungsexponenten haben Obermayer und Pick (Hofm. Beitr. 7) zur Verfolgung des enzymatischen Reaktionsverlaufes anzuwenden versucht. Indessen ändert sich diese Grösse nur bei der tryptischen Verdauung.

Die Methode von Grützner (Pflügers Archiv **8** und **106**) ist eine kolorimetrische. Fibrin, welches man in Salzsäure von 1 p. m. aufquellen lässt, verteilt man möglichst gleichartig in Reagensgläsern von gleichem Durchmesser mit je 15 ccm Salzsäure von 1 p. m. und setzt die zu untersuchende Pepsinlösung zu. Das mit Karmin gefärbte Fibrin wird dann unter Rotfärbung der Flüssigkeit gelöst, und aus der Stärke der Färbung lässt sich der Verlauf der Verdauung annähernd ermitteln. Zum Vergleich beobachtet man eine Reihe von Gläsern mit in bekannten Verhältnissen verdünnter Karminlösung. Dieselben werden so gewählt, dass der Pepsingehalt mit den Nummern der Farbenskala proportional ist. Diese Methode hat neuerdings durch Roaf eine Modifikation erhalten (Biochem. Journ. **3**, 188; 1908).

II. Durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit hat zuerst Sjöqvist (vergl. S. 125) die peptische Verdauung studiert. Späterhin ist diese Methode vielfach zur Anwendung gekommen, so auch für die tryptische Verdauung in Untersuchungen von Henri, Bayliss (vergl. S. 133) und für die Untersuchung der Dipeptidspaltung durch Erepsin (Euler, S. 135). Bei den letztgenannten Versuchen wurde jeder Probe eine konstante Menge Alkalilösung zugesetzt, um die Variation der Leitfähigkeit grösser zu machen.

III. Gegen die Methode von Spriggs, den Fortschritt der Eiweissspaltung durch Messung der inneren Reibung von Eiweisslösungen zu ermitteln, können, wie bereits S. 130 erwähnt, ernstliche Einwände gemacht werden; sie ist also nicht zu empfehlen.

IV. Eine rein chemische Methode von allgemeiner Anwendbarkeit und grosser Genauigkeit hat vor einigen Jahren Sörensen angegeben (Biochem. Z. **7**, 45; 1908).

Diese Methode erlaubt den Gehalt einer Lösung an Eiweisstoffe oder deren Spaltprodukten aus der Zahl der freien Carboxylgruppen zu ermitteln. Dieser Gehalt an Carboxylgruppen lässt sich nämlich titrimetrisch bestimmen, wenn die freien Aminogruppen des Eiweisskörpers vorher gebunden werden. Dies gelingt leicht durch Zusatz von überschüssigem Formol, welches mit den Aminogruppen Methylenverbindungen gibt. Der Zuwachs der Carboxylgruppen repräsentiert die Ausdehnung der Proteolyse, und dieselbe kann demnach durch die entsprechende Anzahl Kubikcentimeter $^{n}/_{5}$ Baryumhydroxydlösung ausgedrückt werden. In der Voraussetzung, dass jede während der Proteolyse gebildete Carboxylgruppe einer Aminogruppe entspricht, lässt sich die Ausdehnung der Proteolyse auch in Milligrammen Stickstoff ausdrücken die Anzahl der verbrauchten Kubikcentimeter $^{n}/_{5}$ Baryt mit 2,8 multipliziert, gibt einfach die Stickstoffmenge in Milligrammen an.

Die Titration geschieht am besten mit Thymolphtalein als Indikator und zwar mit folgenden Lösungen:

a) 0,5 g Thymolphtalein (Grübler-Leipzig) in 1 l 93%igem Alkohol.

b) Formolmischung, die für jede Versuchsreihe frisch dargestellt werden muss. 50 ccm Handelsformol werden mit 25 ccm absolutem Alkohol und 5 ccm Thymolphtaleinlösung und schliesslich $^{n}/_{5}$ normal Barytlauge bis zum schwach grünlichen oder bläulichen Farbenton zugesetzt.

Als Kontrolllösung werden 20 ccm ausgekochtes Wasser verwendet. Es werden zuerst 15 ccm Formolmischung und ca. 5 ccm Baryt zugesetzt, dann wird mit $^{n}/_{5}$-Salzsäure zurücktitriert, bis die Lösung bläulich-opaleszierend erscheint. Dann werden zwei Tropfen Baryt, wodurch die Lösung eine deutlich blaue Farbe annehmen muss, und schliesslich noch zwei Tropfen Baryt, wodurch eine schöne und starke blaue Farbe erreicht wird, zugegeben.

Bis zu dieser letzten Farbenstärke werden die Analysen titriert, indem 20 ccm der Analyse, 15 ccm Formolmischung und gleich darauf ein kleiner Überschuss an Barytlauge zugesetzt werden. Es wird mit HCl zurücktitriert, bis die Farbe schwächer als die der Kontrolllösung erscheint, und schliesslich wird Barytlauge zugetröpfelt, bis die Farbe der Kontrolllösung wieder erreicht worden ist.

Die Ausführung der Titration mit Phenolphtalein muss im Original nachgesehen werden.

Die Methode von Volhard und Löhlein (Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. **49** und Hofm. Beitr. **7**) stützt sich einerseits auf ein von Thomas und Weber, andererseits ein von Meunier (1901) angegebenes Verfahren. Beide gehen vom Kasein aus — Thomas und Weber lösen in 1900 ccm Wasser mit Hilfe von 3,2 g Ätznatron (= 80 ccm $^{1}/_{1}$-n-NaOH) oder 5,04 g Salzsäure (= 138 ccm $^{1}/_{1}$-n-HCl) 100 g Kasein auf. Die alkalische Lösung dient zur Bestimmung von Trypsin, die saure für Pepsin. Nach beendeter Verdauung wird eventuell mit Schwefelsäure angesäuert und mit 20% Glauber-

salzlösung ausgesalzen. Nach dem Filtrieren wird der Niederschlag auf dem Filter mit warmem Wasser ausgewaschen, bis die letzten Spuren von Schwefelsäure verschwunden sind; dann wird das Filter nebst unverdautem Kasein getrocknet und gewogen und das Gewicht des unverdauten Eiweisses mit dem bei einem gleichen blinden Versuche ohne Trypsin oder Pepsin erhaltenen verglichen. Die Menge des in Lösung gegangenen Eiweisses gibt das Maass für die verdauende Kraft des zu bestimmenden Magensaftes.

Nach Meunier wird der zu untersuchende Magensaft (14 ccm) mit Salzsäure (0,4 ccm pur.) und 1 g Kasein versetzt und geschüttelt; nachdem sich das Kasein abgesetzt hat, entnimmt man von der klaren Flüssigkeit 2 ccm und bestimmt darin den Gehalt an freier Salzsäure. Die übrigen 10 ccm mit dem ungelösten Kasein bleiben 24 Stunden im Wasserbade von 40°. Dann wird wiederum in 2 ccm Filtrat die Salzsäure bestimmt. Da durch Pepsinverdauung Salzsäure an Eiweiss gebunden wird, drückt die Abnahme des Wertes für freie Säure den Grad der Pepsinwirkung aus.

Volhard geht nun von der schon oben erwähnten gewichtsanalytischen Methode von Thomas und Weber aus. Diese basiert, wie wir sahen, auf der Erfahrung, dass reines, unverändertes Kasein in Verdauungssalzsäure gelöst, durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Setzt man also unter sonst gleichen Bedingungen einer bestimmten, gleichen Menge Kaseinlösung verschiedene Enzymmengen zu und lässt sie gleich lange im Wasserbad von 40° auf die Eiweisslösung einwirken, so wird der durch Zusatz von Natriumsulfat ausgefüllte Rückstand um so geringer sein, je weniger Kasein unverdaut geblieben, d. h. je mehr durch die Enzymwirkung peptonisiert worden ist: Je grösser der Rückstand, desto geringer die Enzymmenge unter den sonst gleichen Versuchsbedingungen. Auf Grund dieser Erwägung sammeln Thomas und Weber den Niederschlag auf gewogenen Faltenfilter, waschen ihn mit destilliertem Wasser aus, trocknen und wägen ihn. Die Gewichtsdifferenz der Rückstände aus einem pepsinhaltigen und einem pepsinfreien Versuch dient also hier als Maass für die peptische Wirkung.

Die Umständlichkeit dieser Gewichtsbestimmung vermeidet Volhard durch Titration der Filtrate. Er geht von der Annahme aus, dass bei fortschreitender Peptonisierung der Kaseinlösung die Acidität des Filtrates zunehmen müsse, indem die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone das Filter passieren. Seine Versuche ergaben, dass bei Anwendung der gleichen Mengen derselben sauren Kaseinlösung ohne Pepsinzusatz die Acidität des Filtrates stets konstant und viel kleiner war, als dem wahren Säuregehalt der Stammlösung entsprach. Daraus geht hervor, dass unter gleichen Versuchsbedingungen im Kaseinniederschlag stets die gleiche Menge Salzsäure eingeschlossen bleibt und nur die freie Salzsäure ins Filtrat übergeht. Man ist somit berechtigt, einen über die als konstant festgestellte Acidität der betreffenden Stammlösung hinausgehenden Säurewert auf die

ins Filtrat übergegangenen salzsauren Peptone zu beziehen, und aus dem Aciditätszuwachs auf den Verdauungsgrad zu schliessen.

Dementsprechend verhalten sich die Rückstände umgekehrt proportional wie die Aciditäten der Filtrate.

Als Beispiel geben wir folgenden Versuch von Volhard wieder, welcher der Arbeit von Löhlein (l. c.) entnommen ist.

Versuchsanordnung: 100 ccm Kaseinlösung mit 150 ccm Wasser vorgewärmt, werden mit 0,1, 0,4 0,9 ccm Magensaft (Acidität 59 : 87) eine Stunde digeriert; darnach wird im Messzylinder auf 300 ccm aufgefüllt und mit 100 ccm 20 %iger Natriumsulfatlösung das Kasein gefällt. 200 ccm Filtrat der ohne Magensaftzusatz gefällten Stammlösung hatten bei Anwendung von Phenolphtalein die Acidität 19,15.

200 ccm Filtrat von der Probe mit

1. 0,1 Saft = 22,25—19,15 — Saftacid. = 0,043 = 3,06 Aciditätszuwachs
2. 0,4 „ = 25,5 —19,15 — „ = 0,17 = 6,18 „
3. 0,9 „ = 28,5 – 19,15 — „ = 0,387 = 8,96 „

Die Kaseinniederschläge werden auf gewogenem Filter gesammelt und ausgewaschen, nach vollständiger Trocknung noch einmal gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Gewicht des Stammlösungsniederschlages A = 4,104 g
„ „ Niederschlages von 1 3,607 g
„ „ „ „ 2 3,053 g
„ „ „ „ 3 2,585 g

Verdaut wurden also von 0,1 ccm A—1 = 0,497 g
„ 0,4 ccm A—2 = 1,051 g
„ 0,9 ccm A—3 = 1,519 g

Die Proportionalität zwischen obigen Aciditätsgraden und den durch Wägung bestimmten verdauten Mengen ergibt sich aus folgenden Quotienten:

1. $\frac{0,497}{3,06} = 1,63$ 2. $\frac{1,051}{6,18} = 1,70$ 3. $\frac{1,519}{8,96} = 1,69.$

Unter den Arbeiten, in welchen diese Methode in ausgedehntem Maass zur Anwendung gekommen ist, sei besonders die von S. Küttner (H. **52**) genannt.

Für die praktische Anwendung der Volhardschen Methode empfiehlt sich die von Volhard vorgeschlagene Formulierung der Resultate. Man bezeichnet darnach als Pepsineinheit diejenige Enzymmenge, welche das Filtrat der ganzen angewandten Kaseinmenge um 1 ccm 0,1 normaler Säure saurer machen werde.

Durch den Versuch erhält man in dem Quotienten aus dem Aciditätszuwachs, dividiert durch das Produkt t . f (Verdauungszeit und Anzahl der angewandten ccm Saft) den Verdauungswert, den 1 ccm Saft in 1 Stunde liefern würde. Dieser Wert ist mit 2 oder 4 zu multiplizieren, je nachdem 200 oder 100 ccm Filtrat titriert werden. Der so erhaltene Wert der Aciditätszunahme folgt der Schützschen Regel. Für die Pepsineinheit x gilt die Formel

$$x = \frac{v^2}{f \cdot t}.$$

Beispiel: Die Acidität von 200 ccm der Stammlösung nach Fällung und Filtration sei = 18,0, in 400 = 36,0. Die Acidität des Saftes sei = 20 ccm in 100 ccm Saft. Im Versuch wird bei

Digestion von 100 Kaseinlösung auf 300 mit 3 ccm Saft in 3 Stunden nach Auffüllung mit Na_2SO_4 auf 400 und Filtration in 200 ccm Filtrat eine Acidität von 32,7, in 400 = 65,4 ermittelt.

Davon sind abzuziehen für die Stammlösung = 36,0

Saftacid. = 0,6

v = 28,8

$$\sqrt{x} = \frac{28{,}8}{3 \times 3} = 3{,}2 \qquad x = 10{,}24 \text{ Pepsineinheiten.}$$

Zwei einfache und, wie es scheint, zur klinischen Pepsinbestimmung sehr anwendbare Methoden verdankt man Jacoby und Fuld.

Nach Jacoby (Biochem. Z. **1**, 58; 1906) löst man 0,5 g Ricin [1]) in 5%-iger Kochsalzlösung auf und filtriert hierauf. Man erhält dadurch eine opaleszierende Lösung, die sich auf Zusatz von 0,1 normaler Salzsäure trübt. Man vermischt nun gleiche Volumina dieser Lösung mit abnehmenden Mengen verschieden verdünnten Magensaftes und füllt mit destilliertem Wasser oder mit gekochtem Magensaft auf das gleiche Volumen auf. Die verdünnteste, nach dreistündigem Stehen im Thermostaten noch aufgeklärte Probe enthält die kleinste Saftmenge, die das vorhandene Eiweiss vollständig verdauen kann.

Ein Saft, von welchem 1 ccm der hundertfachen Verdünnung dazu ausreicht, enthält 100 Pepsineinheiten. (Der normale Magensaft enthält 100 bis 200 Pepsineinheiten).

Nach Fuld (Fuld und Levison, Biochem. Z. **6**, 473; 1907, siehe auch Zeitschr. f. klin. Med. **64**, 376; 1907) arbeitet man folgendermaassen. Man bereitet eine klare, gekochte Lösung von krystallinischem Edestin (1 : 1000) in $^1/_{300}$ normaler Salzsäure. Hierbei geht das Edestin in das sog. Edestan über.

Der zu untersuchende Magensaft wird nun auf das Zwanzigfache verdünnt und eine Reihe trockener Reagensröhrchen werden mittelst einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten 1 ccm-Pipette mit fallenden Mengen dieses Zwanzigstelsaftes beschickt.

Die Reagensgläser wählt man zweckmässig eng, von einem Durchmesser von etwa 1 cm^2; man vermeidet dann leichter eine Mischung beim Überschichten.

In die mit dem verdünnten Mageninhalt versehenen Gläser bringt man nun, rasch arbeitend, die gewählte Menge Edestinlösung, z. B. 2 ccm. Nach Ablauf von 30 Minuten wird Ammoniak zugegeben. Nachdem alle Proben überschichtet sind, am besten die pepsinreichsten zuerst, betrachtet man die Reihe in auffallendem Licht gegen einen schwarzen Hintergrund. Man notiert nun die pepsinärmste Probe ohne Ring und berechnet daraus die Stärke des Saftes.

[1]) Zu beziehen von Merck oder den Vereinigten Chemischen Werken Charlottenburg.

Diese Rechnung führt man so aus, dass man die Anzahl ccm Pepsinlösung resp. Magensaft, die die Probe enthält, dividiert durch das Produkt aus deren Verdünnung und der Anzahl Kubikcentimeter Edestinlösung, die ausverdaut wurden. Wenn also von der zwanzigfachen Verdünnung des Mageninhaltes 0,25 ccm eben hinreichen, um das Auftreten des Ringes in 2 ccm Edestinlösung zu verhindern, so ist die gesuchte Zahl $0{,}25 : 20 \times 2 = 1 : 160$. Man bezeichnet darnach den Mageninhalt als ein Pepsin 1 : 160 oder man sagt, der Saft ist 160fach, bezw. er enthält 160 Pepsineinheiten.

Die Methoden von Jacoby und Fuld sind neuerdings vielfach geprüft und durchgehends als sehr brauchbar befunden worden.

Witte (Berl. klin. Woch. 1907) bringt an der Jacobyschen Methode die kleine aber wohl nicht unwesentliche Modifikation an, dass er den Magensaft vor Mischung einer Probe genau neutralisiert, wodurch die Ergebnisse viel exakter werden.

Auch Reicher (Wien. klin. Woch. 1907) gibt diesen beiden Verfahren den Vorzug vor allen älteren quantitativen Methoden. Er fand gleichfalls den Einfluss der Acidität recht erheblich und stimmt dem Vorschlag von Witte, den Magensaft zu neutralisieren, zu. Auch Solms (Zeitschr. f. klin. Med. **64**, 159; 1907) hat mit der Jacobyschen Methode günstige Resultate erzielt.

Einhorn (Berl. klin. Woch. 1908) schlägt eine Vereinfachung der Jacobyschen Methode vor, welche in der Anwendung eines besonders konstruierten Apparates zur Ausführung der Verdünnungsproben besteht. In diesem Apparat, einem Vakuumglasgefäss, befindet sich Wasser von 50—60° und ein Gestell von graduierten Proberöhrchen, welche die Verdauungsmischung enthalten. Die Versuchszeit kann auf $^1/_2$ Stunde verkürzt werden.

Unter den Arbeiten, bei welchen die Fuld-Levisonsche Methode mit Erfolg zur Anwendung kam, ist besonders die von Wolff und v. Tomaszewski (Berl. klin. Woch. 1908) zu nennen.

Die Methode von Mett besteht bekanntlich darin, dass man Hühnereiweiss in einem Glasrohr von 1—2 mm Durchmesser aufsaugt, dieses in dem Rohr bei 95° koaguliert und die in einer Länge von etwa 2 cm scharf abgeschnittenen Teile des Rohres in die pepsinhaltige Flüssigkeit legt. Nach 10 Stunden misst man die Länge des verdauten Zylinders, welche indessen nicht mehr als etwa 6 mm betragen soll. Die Pepsinmengen in den zu vergleichenden Proben verhalten sich wie die Quadrate aus den Längen der verdauten Eiweisszylinder.

An diese Methode, welche den gleichen Einwänden ausgesetzt ist, welche bereits S. 214 angedeutet wurden, erinnert diejenige von Fermi, welche auf der Auflösung von erstarrten Gelatinescheiben beruht.

Hattori (Arch. int. de Pharm. et de Thérap. 1908) hat hervorgehoben, dass Gelatine im allgemeinen viel rascher verdaut wird, als geronnenes Eiweiss und dass hier eventuell zwei verschiedene Enzyme wirksam sind. Diese Annahme ist immerhin hypothetisch und die darauf gegründete Kritik der Methode von Fermi nicht genügend stichhaltig.

Trypsin- und Erepsinbestimmung.

Die Mehrzahl der oben erwähnten, für die Pepsinbestimmung ausgearbeiteten Methoden lassen sich durch geeignete Modifikation auch zur Verfolgung der tryptischen Verdauung verwenden. Dies gilt von den optischen Methoden, von der Methode der Leitfähigkeit (vergl. Henri und Bayliss S. 133) u. a.

Die Anwendung der Volhardschen Methode (vergl. S. 218) zur Trypsinbestimmung beschreibt Löhlein (l. c.). Das Verfahren unterscheidet sich von dem früher beschriebenen nur darin, dass bei der Pepsinuntersuchung die Salzsäure zur Stammkaseinlösung vor der Verdauung, bei der Trypsinuntersuchung aber nach der Verdauung zugesetzt wird.

Eine ähnliche Methode brachte R. Goldschmidt zur Anwendung (Dtsch. med. Wochenschr. 1909).

Auch die Jacobysche Ricinmethode lässt sich zur Trypsinbestimmung verwerten (Biochem. Z. **10**, 229; 1908). Von Merckschem Ricin wurde 1 g in 100 ccm $1^1/_2$%iger Kochsalzlösung gelöst. In eine Reihe von Röhrchen kommen zunächst 2 ccm der eben beschriebenen Ricinlösung, ferner

$$0 — 0{,}1 — 0{,}2 — 0{,}3 — 0{,}5 — 0{,}7 — 1{,}0$$

einer 1%igen Lösung von Grüblers Trypsin. Mit Wasser wird auf 3 ccm aufgefüllt und überall 0,5 ccm Soda (1%) zugesetzt. Das Röhrchen ohne Trypsin bleibt dauernd trübe, die übrigen hellen sich allmählich auf, das mit 0,1 Trypsin ist nach 6 Stunden Aufenthalt im Brutschrank ganz klar.

Chymosin. Die Wirksamkeit bestimmt man in der Weise, dass man die Verdünnung ermittelt, bei welcher eine gewisse Menge Milch bei 40° in 30 Minuten zur Koagulation gebracht werden kann (K. Glaessner, Hofm. Beitr. **1**; Hammarsten, H. **22**).

Da die für Labbestimmungen verwandte käufliche Milch hinsichtlich ihres Chymosingehaltes sehr stark variiert, so schlagen Blum und Fuld (Berl. klin. Wochenschr. 1905 und Biochem. Zeitschr. **4**, 62; 1907) vor, an Stelle der Milch ein Milchpulvergemisch anzuwenden, das fabrikmässig hergestellt wird und seiner Zusammensetzung nach konstant ist. Von diesem Milchpulver werden 3 Gramm mit dem neunfachen Gewicht Wasser zusammengebracht. Dies geschieht so, dass die abgewogene (oder in ausgewogenem Hohlmass unter Klopfen und Glattstreichen abgemessene) Menge Milchpulver in kleinen Portionen unter Umrühren in so viel destilliertes Wasser gegeben

wird, dass ein halbflüssiger Teig entsteht, worauf der Rest des Wassers zugesetzt wird. Unter mässigem Umrühren geht nun fast alles in Lösung, ohne dass irgend welches Erwärmen erforderlich wäre. Diese Lösung, deren Herstellung nur ein paar Minuten dauert, kann man ohne weiteres benutzen, wenn man nur das allerunterste fortlässt. Andererseits kann man sie im Eisschrank bis drei Tage aufbewahren. Jedenfalls ist ein Calciumzusatz, wie er von den Verfassern in der ersten Mitteilung verlangt wurde, nicht nötig.

Es werden nun 20 Röhrchen folgendermassen gefüllt:

Man nimmt von unverdünntem Magensaft folgende Mengen:

0,10; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68; 1,0;

von der zehnfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68;

von der hundertfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68.

Das zwanzigste Röhrchen bleibt zu Kontrollzwecken mit 1,5 ccm gekochtem reinen Saft reserviert.

Diese Proben, welche (abgesehen von der letzten) den Inhalt in einer Verdünnung von 1 : 10 bis 1 : 10000 enthalten (eine Vorprobe kann daher unterbleiben), werden in Wasserbad von Zimmerwärme, ein grosses Gefäss mit Wasser von 17,5° C. gesetzt, worin sie zwei Stunden verbleiben.

Alsdann werden sie mit je einem Tropfen 20%iger Clorcalciumlösung versetzt und in ein Wasserbad von 40° auf fünf Minuten übertragen. Das Verhältnis Mageninhalt : Milchpulverlösung in der schwächsten gerinnenden Mischung gibt direkt den Labwert des Mageninhalts an und damit zugleich dessen Fermentgehalt im allgemeinen. Natürlich kann noch eine genauere Bestimmung an diese erste und auf Grund der durch sie gewonnenen Anhaltspunkte sofort oder (bei Vorhandensein eines Eisschrankes) am nächsten Tag angeschlossen werden.

Zymase. Zu technischen Zwecken oder wenn nicht der höchste Grad von Genauigkeit erforderlich ist, bestimmt man die Gärkraft eines Hefepresssaftes oder der Dauerhefe in der Weise, dass man in einem kleinen Erlenmeyerkolben (100 ccm), der ein Meisslsches Ventil trägt, 20 ccm Presssaft (2 g Dauerhefe mit 8 g Rohrzucker bezw. 10 g Wasser und 4 g Rohrzucker) unter Zusatz von Toluol mischt und den Gewichtsverlust nach einem, zwei, drei und vier Tagen bei 22° bestimmt. Man beobachtet eine Abnahme von etwa 1—2 g Kohlendioxyd (E. und H. Buchner und M. Hahn, l. c. S. 80).

Für genauere Bestimmungen treibt man die Kohlensäure durch einen gelinden Luftstrom aus der Lösung oder man lässt die Gasentwickelung unter vermindertem Druck vor sich gehen und bestimmt dann die entwickelte Kohlensäuremenge volumetrisch.

Oxydase und Peroxydase. Hinsichtlich der zahlreichen Reaktionen, welche zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung der Oxydasen zur Anwendung gekommen sind, verweise ich auf S. 40. Da, wie daselbst erwähnt, eine allgemeine quantitative Bestimmungsmethode für Oxydasen wohl nicht existiert, sollen die Vorschriften, welche zum Studium spezieller Oxydasen gegeben worden sind, hier nicht angeführt werden. Wir erinnern nur an die S. 159—160 kurz angedeuteten Methoden.

Katalase. Da die Bestimmung des Katalasegehaltes im Blut und anderen Körperflüssigkeiten nunmehr zu den häufigeren physiologisch-chemischen Aufgaben gehört, seien die wichtigsten Methoden hier in Kürze erwähnt.

In wässerigen Lösungen gereinigter Katalasen wird das unzersetzte Wasserstoffsuperoxyd meistens durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt. Am besten eignen sich Wasserstoffsuperoxydkonzentrationen von etwa $^1/_{20}$—$^1/_{50}$ Normalität, die nach Ansäuern mit Schwefelsäure mit 0,01 normalem $KMnO_4$ titriert werden. Diese Methode ist, wie schon Bredig bei seinen Untersuchungen mit kolloiden Metallen gefunden hat, in vielen Fällen den volumetrischen Bestimmungen vorzuziehen.

Untersucht man eine Organflüssigkeit direkt, so können allerdings Volum- und Druckmethoden entschiedene Vorteile besitzen. Eine Volummethode ist von L. v. Liebermann angewandt worden (Pflüg. Arch. **104**), neuerdings auch von Santesson, und kürzlich hat W. Löb eine Anordnung beschrieben (Biochem. Z. **13**), welche offenbar schnelle und genaue Messungen des Katalasegehaltes gestattet. In der gleichen Mitteilung beschreibt Löb eine Druckmethode, welche in gewissen Fällen ebenfalls gute Dienste tun wird.

Tabellen zur Zuckerbestimmung nach Bertrand.

Glukose.

Vierte Krystallisation: $[\alpha]_D = \frac{+ 4^0 07 \times 50{,}1 \text{ ccm}}{1 \text{ g } 960 \times 2^d} = + 52^0.$

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	20,4	41	79,3	71	131,4
11	22,4	42	81,1	72	133,1
12	24,3	43	82,9	73	134,7
13	26,3	44	84,7	74	136,3
14	28,3	45	86,4	75	137,9
15	30,2	46	88,2	76	139,6
16	32,2	47	90,0	77	141,2
17	34,2	48	91,8	78	142,8
18	36,2	49	93,6	79	144,5
19	38,1	50	95,4	80	146,1
20	40,1	51	97,1	81	147,7
21	42,0	52	98,9	82	149,3
22	43,9	53	100,6	83	150,9
23	45,8	54	102,3	84	152,5
24	47,7	55	104,1	85	154,0
25	49,6	56	105,8	86	155,6
26	51,5	57	107,6	87	157,2
27	53,4	58	109,3	88	158,8
28	55,3	59	111,1	89	160,4
29	57,2	60	112,8	90	162,0
30	59,1	61	114,5	91	163,6
31	60,9	62	116,2	92	165,2
32	62,8	63	117,9	93	166,7
33	64,6	64	119,6	94	168,3
34	66,5	65	121,3	95	169,9
35	68,3	66	123,0	96	171,5
36	70,1	67	124,7	97	173,1
37	72,0	68	126,4	98	174,6
38	73,8	69	128,1	99	176,2
39	75,7	70	129,8	100	177,8
40	77,5				

Invertzucker.

0,5 %ige Lösung, erhalten durch Hydrolyse von 4,750 g Saccharose, gelöst in 50 ccm 2 %iger Salzsäure. Die Lösung wurde während 10—15 Minuten erhitzt, erkalten gelassen, neutralisiert und auf einen Liter verdünnt.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	20,6	41	79,5	71	130,8
11	22,6	42	81,2	72	132,4
12	24,6	43	83,0	73	134,0
13	26,5	44	84,8	74	135,6
14	28,5	45	86,5	75	137,2
15	30,5	46	88,3	76	138,9
16	32,5	47	90,1	77	140,5
17	34,5	48	91,9	78	142,1
18	36,4	49	93,6	79	143,7
19	38,4	50	95,4	80	145,3
20	40,4	51	97,1	81	146,9
21	42,3	52	98,8	82	148,5
22	44,2	53	100,6	83	150,0
23	46,1	54	102,3	84	151,6
24	48,0	55	104,0	85	153,2
25	49,8	56	105,7	86	154,8
26	51,7	57	107,4	87	156,4
27	53,6	58	109,2	88	157,9
28	55,5	59	110,9	89	159,5
29	57,4	60	112,6	90	161,1
30	59,3	61	114,3	91	162,6
31	61,1	62	115,9	92	164,2
32	63,0	63	117,6	93	165,7
33	64,8	64	119,2	94	167,3
34	66,7	65	120,9	95	168,8
35	68,5	66	122,6	96	170,3
36	70,3	67	124,2	97	171,9
37	72,2	68	125,9	98	173,4
38	74,0	69	127,5	99	175,0
39	75,9	70	129,2	100	176,5
40	77,7				

Mannose.

Dritte Krystallisation: $[\alpha]_D = \frac{+3^0 48 \times 25^{ccm}}{1^g\ 250 \times 5^d} = +13^0 92$ ($t = 21^0$).

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	20,7	60	113,3
20	40,5	70	130,2
30	59,5	80	146,9
40	78,0	90	163,3
50	95,9	100	179,4

Galaktose.

Fünfte Krystallisation: $[\alpha]_D = \frac{+16^0 03 \times 25\,ccm}{2\,g\ 500 \times 2^d} = +80^0 16$ $(t = 20^0)$.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	19,3	41	75.6	71	126,6
11	21,2	42	77,4	72	128,3
12	23,0	43	79,1	73	130,0
13	24,9	44	80,8	74	131,5
14	26,7	45	82,5	75	133,1
15	28,6	46	84,3	76	134,8
16	30,5	47	86,0	77	136,4
17	32,3	48	87,7	78	138,0
18	34,2	49	89,5	79	139,7
19	36,0	50	91,2	80	141,3
20	37.9	51	92,9	81	142.9
21	39,7	52	94,6	82	144.6
22	41,6	53	96,3	83	146,2
23	43,4	54	98,0	84	147,8
24	45,2	55	99,7	85	149.4
25	47.0	56	101,5	86	151,1
26	48,9	57	103,2	87	152,7
27	50,7	58	104,9	88	154,3
28	52.5	59	106,6	89	156,0
29	54,4	60	108,3	90	157.6
30	56,2	61	110,0	91	159,2
31	58,0	62	111,6	92	160,8
32	59,7	63	113 3	93	162,4
33	61,5	64	115,0	94	164,0
34	63,3	65	116,6	95	165,6
35	65,0	66	118,3	96	167,2
36	66,8	67	120,0	97	168,8
37	68,6	68	121,7	98	170,4
38	70,4	69	123,3	99	172,0
39	72,1	70	125,0	100	173.6
40	73,9				

Maltose.

Dritte Krystallisation: $[\alpha]_D = \frac{+26^0 10 \times 25\,ccm}{2\,g\,500 \times 2^d} = +130^0 5$ $(t = 20^0)$.

Der angegebene Drehungswinkel bezieht sich auf das Hydrat: $C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O$, die Tabelle dagegen auf das Anhydrid.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	11,2	15	16,7	20	22,2
11	12,3	16	17,8	21	23,3
12	13,4	17	18,9	22	24,4
13	14,5	18	20,0	23	25,5
14	15,6	19	21,1	24	26,6

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
25	27,7	51	56,1	76	82,9
26	28,9	52	57,1	77	84,0
27	30,0	53	58,2	78	85,1
28	31,1	54	59,3	79	86,1
29	32,2	55	60,3	80	87.2
30	33.3	56	61,4	81	88,3
31	34,4	57	62,5	82	89.4
32	35,5	58	63,5	83	90,4
33	36,5	59	64,6	84	91,5
34	37,6	60	65,7	85	92,6
35	38,7	61	66,8	86	93,7
36	39,8	62	67,9	87	94,8
37	40,9	63	68,9	88	95,8
38	41 9	64	70,0	89	96,9
39	43,0	65	71,1	90	98,0
40	44,1	66	72,2	91	99,0
41	45,2	67	73,3	92	100.1
42	46,3	68	74,3	93	101,1
43	47,4	69	75 4	94	102,2
44	48,5	70	76,5	95	103,2
45	49,5	71	77,6	96	104,2
46	50,6	72	78,6	97	105,3
47	51,7	73	79,7	98	106,3
48	52,8	74	80,8	99	107,4
49	53,9	75	81,8	100	108,4
50	55,0				

Laktose.

Fünfte Krystallisation: $[\alpha]_D = \frac{+ 13^0 63 \times 50 \text{ ccm}}{2 \text{ g } 500 \times 5^d} = + 54^0 5 \ (t = 19^0)$.

Der angegebene Drehungswinkel bezieht sich auf das Hydrat: $C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O$, die Tabelle dagegen auf das Anhydrid.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	14,4	24	33,9	38	52,7
11	15,8	25	35,2	39	54,1
12	17,2	26	36,6	40	55,4
13	18,6	27	38,0	41	56,7
14	20,0	28	39,4	42	58,0
15	21,4	29	40,7	43	59,3
16	22 8	30	42,1	44	60,6
17	24,2	31	43,4	45	61.9
18	25,6	32	44,8	46	63,3
19	27,0	33	46,1	47	64,6
20	28,4	34	47.4	48	65,9
21	29,8	35	48,7	49	67,2
22	31,1	36	50,1	50	68,5
23	32,5	37	51.4	51	69,8

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
52	71,1	69	92,8	85	112,9
53	72,4	70	94,1	86	114,1
54	73,7	71	95,4	87	115,4
55	74,9	72	96,6	88	116,6
56	76,2	73	97,9	89	117,9
57	77,5	74	99,1	90	119,1
58	78,8	75	100,4	91	120,3
59	80,1	76	101,7	92	121,6
60	81,4	77	102,9	93	122,8
61	82,7	78	104,2	94	124,0
62	83,9	79	105,4	95	125,2
63	85,2	80	106,7	96	126,5
64	86,5	81	107,9	97	127,7
65	87,7	82	109,2	98	128,9
66	89,0	83	110,4	99	130,2
67	90,3	84	111,7	100	131,4
68	91,6				

CHEMICAL SOCIETY
BURLINGTON HOUSE, W.

Autorenverzeichnis.

A.

Abderhalden 8, 23, 27, 28, 29, 45, 72, 76, 83, 85, 102, 103, 137—140, 165, 200, 217.
Abelous 47, 191.
Aberson 152, 174.
Achalme 196.
Acree 190.
Agulhon 83.
Albert 39.
Antoni 39.
Armstrong, E. F. 15—17, 68, 102, 119, 120, 122, 123, 188.
Armstrong, H. E. 9, 17, 108, 115, 123, 200.
Arrhenius 91, 94—98, 106, 107, 110, 122, 126, 128, 131, 133, 141—143, 145—147, 168, 171, 197.
Arthus 83.
Ascher 83, 84, 86.
Ascoli 11, 12, 27, 194, 195.
Aso 42.
Auld 71, 101, 123, 124, 173, 189, 216.

B.

Bach 43, 45—47, 91, 156—159, 161—165, 239.
Baker 11.
Bang 32, 74, 147, 216.
Barth 207.
Bashford 197.
Batelli 43, 46, 197.
Baur, E. 9.
Bayliss 27, 59, 65, 73, 75, 91, 102, 133, 134, 174, 192, 196, 217, 223.
Bearn 172.
Bechhold 59.
Behrend 9.
Beijerinck 11, 15, 19, 20.
Beitzke 192, 194.
Benjamin 33.
Berg 67.
Bergell 26, 180, 194, 195.
v. Bergmann, G. 196.
Bertarelli 193, 194.
Bertrand 23, 41, 42, 45, 71, 74, 76, 159, 200, 214, 215, 261, 239.
Bezzola 195.
Bial 12.
Bickel 180.
Biedermann 11.
Bierry 18, 58, 60, 70, 78, 122, 200.
Biernacki 172.
Blake 60.
Bliss 25.
Bloch 30.
Blum 194, 223.
Blunt 178.
Bodenstein 91—94, 110, 114, 183, 185, 190.
Bokorny 122.
Boldyreff 66.
Bolin 42, 44, 58, 159.
Bonfanti 12.
Bordet 83, 107.
Borissow 125, 133, 137.
Bourquelot 10, 14—20, 23, 40, 69.
Boysen-Jensen 36.
Braun, K. 9, 194.
Bredig 46, 47, 87, 205, 206, 210, 225.
Brieger 195.
Brown, A. 91, 117,
Brown, H. F. 10—12, 15, 91, 112, 113.
Brown, R. 55.
Brücke 25.
Bruno 65.
Buchner, E. 29, 34—36, 38, 39, 44, 57—59. 66, 74, 83, 85, 150, 153, 199, 211, 224.
Buchner, H. 38, 224.
Bull 207.
Burian 31, 40, 85.
Butkewitsch 11, 12, 71.

C.

Caemmerer 83, 85.
Caldwell 17, 18.
Mc Callum 23.
Campbell 13.
Camus 9, 86, 173, 195.
Carlson 12.
Chanoz, H. 10.
Charrin 195.
Chigin 142.
Chittenden 28, 69, 77, 86.
Chočensky 38.
Chodat 43, 44, 45, 46, 103, 161, 162, 173, 174.
Chodschejew 58.
Chrzaszcz 11.
Clark 21.

Claus 37.
Coehn 60.
Coggi 195.
Cohnheim O., 14, 27, 28, 37, 65.
Cohnheim, J. 12.
Cole 69, 78, 80.
Connstein 8, 9, 108.
Courtauld 17, 18.
Cramer 172.
Cremer 190.
Czyhlarz 40.
Czapek 10.

D.

Dakin 10, 30, 204.
van Dam 74.
Danilewski 65, 81, 191.
Dean 14.
Delbrück 9.
Deleano 44, 59.
Delezenne 65, 66, 75, 176, 195, 196.
Detmer 113, 213.
Devaux 23.
Dietz 8, 110, 185.
Dietze 72, 73.
Donath 207.
Dony-Hénault 42, 158.
Doyon 9, 10.
Downes 178.
Dreyer 179.
v. Drjewezki 71.
Duchaček 39, 239.
Duclaux 3, 83, 84, 114.
Dunstan 20, 216.
Durham 77.
van Duuren 158.

E.

Edelstein 180.
Effront 10, 13, 69, 77, 78, 83, 113, 172.
Ehrenreich 57.
Ehrlich, F. 31.
Elvove 10, 47.
Embden 37.
Emmerling 28, 177, 188, 190.
Engel 106, 211.
Ernest 38.
Euler 29, 42, 44, 46, 58, 62, 72—76, 79—83, 85, 91, 102, 107, 135, 150, 155, 157, 159, 167, 168, 171, 174, 187, 217.

F.

Faitelowitz 46, 75, 83, 85.
Fajans 205.
Farr 85.
Fränkel 14.
Laubel 134.
Fermi 18, 21, 58, 83, 177, 195, 196, 222.
Fernbach 58, 82, 191.
Finsen 177.
Fischer, E., 15—17, 20—22, 26, 37, 54, 83, 85, 120, 135, 188, 200—203, 206, 211.
Foà 69.
Ford 66.
Foster 12.
Franzen 205.
Freudenreich 85.
Freundlich 50, 53, 62.
Friedenthal 25, 197, 207.
v. Führt 40, 66, 165.
Fuhrmann, 9, 20.
Fuld 33, 34, 85, 146, 149, 174, 197, 221—223.

G.

Gall 12.
Gatin 48.
Gaunt 44.
Gengou 83, 197.
Gerard 9, 18.
Gerber 34, 74, 77, 78, 146, 174, 177.
Geret 29, 85.
Gerhartz 180.
Gessard 197.
Gewin 33.
Giaja 18, 200.
Gigon 77, 102, 103.
Gizelt 86.
Glaessner 195, 223.
Glendinning 91, 101, 112, 113, 191.
Gley 15, 195.
Glinski 214.
Glover 115.
Gockel 86.
Godlewski 37.
Goldschmidt, Heinr. 103.
Goldschmidt, R. 223.
Gonnermann 18, 45.
Gottlieb 48.
Green 9, 11, 12, 14, 20, 28, 34, 68, 178.
Gries 67.
Grignard 203.
Grigoriew 152.
Gross 129.
Grüss 57, 78.
Grützner 67, 84, 217.
Guggenheim 45, 165.
Guignard 18, 20, 176.
Gulewitsch 26
Guthrie 66.

H.

Hafner 22.
Hahn 29, 38, 66, 85, 195, 224.
Hall 65.
Halliburton 12.
Hamburg 14.
Hamburger 11, 15, 20, 65, 210
Hammarsten 26, 32—35, 58, 59, 69, 74, 145, 149, 150, 197, 223.
Handovsky 60, 61.
Hanriot 10, 91, 173, 190.
Hansen 15, 61, 146.
Hanssen O., 179.
Harden 3, 39, 66, 150, 153, 154, 204.
Hardy 63.
Hart 23.
Hattori 223.
Hedin 27, 53, 56, 57, 71, 91, 134, 135, 195.
Heffter 47.
Hekma 21, 65.
Henneberg 82.
Henri 61, 91—94, 101, 113, 114, 117, 119, 120, 124, 133, 152, 180, 183, 184, 217, 223.
Henry 20, 189, 216.
Heron 15.
Hérissey 11, 17—20, 23, 120.
Herlitzka 26.
Hertel 177.
Herzog 55, 120, 123, 142, 152, 173, 174, 191, 194.
Hildebrandt 71, 193.
Hill 3, 15, 58, 120, 186, 188, 189.
Hinkins 190.
Höber 62, 87.
van't Hoff 167, 182, 183, 184, 188.
Hoffmann, F. A. 68, 83.

Hofmeister 61, 63.
Horton 17, 123.
Hoyer 9, 66, 68, 69, 77, 79, 108.
Huber 83.
Hubert 58.
Hudson 69, 90, 114, 239.
Hüfner 207.
Huerre 176.
Huiskamp 35.
Huppert 128.

I.

Issaew 22.
Issajew 155, 156.
van Italie 155, 176.
Iwanoff 29, 30.
Izar 78.

J.

Jacobson 74.
Jacoby 26, 43, 58, 59, 197, 221, 222, 223.
Jamada 178.
Jastrowitz 98.
Jerusalem 165.
Jochmann 195.
Jodlbauer 178, 180.
Jones 30, 31.
Jonescu 176.

K.

Kalaboukoff 8.
Kalanthar 16.
Kanitz 8, 72, 76, 107, 210.
Kantorowicz 195.
Karamitsas 180.
Kassarnowski 55.
Kastle 10, 21, 40, 47, 83—85, 87, 91, 105, 106, 155, 161, 173, 174, 176, 190, 200, 201.
Kaufmann 84.
Kikkoji 30, 71.
Kirchhoff 12.
Kjeldahl 83, 114, 128, 135, 174, 175.
Klatte 57, 59.
Klempin 113.
Knauthe 11.
Kobert 18.
Koelker 72, 137—140.
Köttlitz 149.
Kohl 178, 189.
Kossel 30, 140.
Kostytschew 37, 38.
Kotake 48.
Krafft 54.
Kröber 120, 173.
Krüger 22, 78.
Kudo 72, 78.
Kühne 100, 102.
Küttner 220.
Kurajeff 191.
Kussmaul 194.
Kutscher 28, 30.

L.

Laborde 20.
Lalou 124.
Landsteiner 195.
Langley 66, 69.
Laqueur 66, 85.
Larguier des Bancels 133.
Larin 66, 67.
Lawrow 191.
Lea 30.
Lesser 155.
Leube 30.
Leuchs 12.
Levaditi 195.
Levison 221, 222.
Levites 78.
Lewkowitsch 9.
v. Liebermann 46, 155, 225.
Lindberger 72.
Lindet 43.
Lindner 15.
Lintner 13, 71, 78, 112, 120, 173, 207, 212.
v. Lippmann 4.
Lobassow 142.
Lockemann 78, 178, 180.
Loeb, Jacques 76, 82, 133.
Loeb, L. 35.
Löb, W. 225.
Löhlein 134, 218, 223.
Loercher 74.
Loevenhart 10, 46, 65, 83—85, 87, 91, 106, 155, 161, 173, 174, 190, 200, 201.
Loew, O. 13, 42, 46, 76, 154—156.
Loewenherz 200.
Loewenthal 180, 181.
Lohmann 28.
London 141, 143—145.
Luckhardt 12.
Luther 210.

M.

Macleod 9.
Madsen 147, 171, 177, 197.
Magnus, R. 10, 65, 197.
Malfitano 75.
Mallèvre 24, 76.
Mangin 23.
Maquenne 11, 112, 191.
Marckwald 203, 204, 206.
Martin 149.
Martinand 42.
Maxwell 49.
Mayer, P. 8.
Mays 27.
Mc. Grillowry 10.
Mc. Kenzie 203, 204.
Medwedew 91, 158.
Meisenheimer 3, 4, 35, 36, 39, 44, 66, 150, 153, 199.
Mendel 12.
Mett 113, 131, 133, 173, 214, 222.
Meunier 218, 219.
Meyer, Kurt 129, 130.
Michaelis 26, 53, 54, 57, 59 bis 61, 137, 193.
Millner 50.
Millon 47.
Miquel 173.
Molisch 14, 47.
Moll 196.
Montesano 21.
Moore 99.
v. Moraczewski 66, 207.
Morawitz 35, 65.
Morel 9.
Morgenroth 196, 197.
Moritz 11, 101, 191.
Morris 10—12.
Mouton 176.
Müller, Ed. 214.
Müller, Thurgau 113.
Münz 84.

N.

Nagayama 27.
Nasse 12, 86.
Neilson 78.
Nencki 25, 33.

Nernst 110.
Neppi 27.
Neuberg 8, 18, 45, 180, 192, 193, 194.
Nicloux 9, 110, 171.
Niebel 15, 22.
Novy 25.
Nürnberg 191.

O.

Obermayer 217.
Okuneff 191.
Oppenheimer, C. 53.
Oppenheimer, S. 47.
Ormerod 68, 108, 200.
Osaka, Y. 99.
Osborne 13, 22, 78.
Oshima 22.
Ostwald, Wilh 50, 92, 130, 170, 210.
Ostwald, Wo. 178.
Overton 87, 191.

P.

Pagenstecher 8.
Palladin 37, 38.
Pantanelli 189.
Parrozani 7.
Pasteur 201.
Patten 82.
Pauli 60, 61, 62, 63.
Payen 12.
Pawlow 24, 26, 27, 33, 65, 75, 81, 113, 200.
Pekelharing 25, 33, 34, 35.
Pernossi 58, 83, 177.
Persoz 12.
Pewsner 144.
Pfleiderer 66, 67, 84.
Philoche 119, 239.
Pick 12, 217.
Pinkussohn 83, 84, 85.
Pohl 40.
Pollak 27, 72, 133.
Pomeranz 186.
Posternak 62.
Pottevin 9, 11, 17, 76, 190.
Pozarski 176.
Pozzi-Escot 47.
Preti 78.
Price 167.
Pringsheim 31.
Pugliese 12, 85, 195.

Q.

Quincke 56.

R.

Rachford 65, 66.
Rapp 74.
Raudnitz 46.
Reichel 66, 85, 86, 146, 147 bis 149.
Reicher 222.
Reiss 46.
Resenscheck 59.
de Rey-Pailhade 47.
Ribaut 191.
Richter, P. F. 180.
Roaf 217.
Roberts 213.
Robertson 22, 73, 192.
Rödén 197.
Röhmann 11, 15, 37, 40.
Roger 12, 77.
Rona 54, 59.
Rosenberg, T., 77.
Rosenblatt 45.
Rosenfeld 43, 86, 192.
Rosenthaler 190, 204.
Rostocki 24.
Roth, W. A. 210.
Rouge 9, 107.
Rowland 71, 211.
Rozenband 74.

S.

Sachs, Fr. 29, 30, 194.
Saiki 12.
Sailer 85.
Salaskin 191.
Salazar 70, 122.
Salkowski 22, 172.
Samojloff 125.
Santesson, C. G. 84, 225.
Sarthou 42.
Sawitsch 33.
Sawjaloff 33, 191.
Schade 36.
Schaeffer 58, 61, 78.
Schaer 40.
Schapirow 65.
Schardinger 47.
Schellenberg 10.
Schittenhelm 29, 30, 31.
Schlesinger 85.
Schmidt, Alex. 34.
Schmidt, C. L. A. 73.
Schmidt-Nielsen, Signe 171, 178, 179.
Schmidt-Nielsen, Sigval 26, 33, 171, 178—180.
Schmiedeberg 10.
Schmitt, A. 207.
Schneegans 19.
Schöndorff 86.
Schorstein 10.
Schrumpf 25.
Schütz, E. 95, 96, 98, 104, 106, 107, 110, 113, 125, 126, 127 bis 137, 149, 208, 217, 220.
Schütz, J. 78.
Schütze, A. 193, 194, 195.
Schützenberger 19.
Schumoff-Siemanowski 8.
Schwarzschild 26, 27.
Schwiening 71.
Scurti 7.
Segelke 146.
Senter 75, 84, 85, 87, 155, 156, 171, 174.
Shaklee 171.
Shedd 40.
Sieber 8, 25, 33, 37.
Siedentopf 55.
Sigmund 9, 19, 83.
Simnitzki 195.
Sjöquist 66, 67, 125, 127, 128, 129, 217.
Slator 175.
Slowtzoff 42, 158.
Sörensen 23. 64, 68, 69, 70, 115, 119, 132, 157, 217.
Solms 222.
Sommer 47.
Soxleth 146, 212.
Spiro 33, 66, 85, 86, 146, 147, 148, 149, 197.
Spitzer 37, 40, 43.
Spohr 167.
Spriggs 130, 217.
Stade 106, 211.
Stangassinger 48.
v Stenitzer 195.
Stern 197.
Stevens 43.
Starling 75, 196.
Stiles 82.
de Stöcklin 40, 42, 44.
Stoklasa 38.

Stone 12.
Storch 146.
Strada 58.
O'Sullivan 22, 69, 114, 116, 119, 172, 174, 175, 189, 211.
Suzuki, N. 23.

T.

Takaishi 23.
Takamine 12.
Tammann 100, 122, 169—175, 186.
Tanret, Ch. 19, 189.
Tanret, G. 19.
v. Tappeiner 180.
Taylor, A. E. 73, 111, 113, 140, 174, 185, 190, 192.
Tebb 11, 15.
Terroine 8, 119.
Terry 78.
Thies 78, 178, 180.
Thomas 218, 219.
Tichomirow 26.
Tierfelder 37.
v. Tomaszewski 222.
Tompson 22, 69, 114, 116, 119, 172, 174, 175, 189, 211.
Trautz 179.
Trebing 195.
Trillat 42.
Trommsdorff 47.
Tscherniak 43.
Tschirch 43.
Twitchel 81.
Twort 18.

U.

af Ugglas 80, 119, 171, 174, 175.

V.

Vandevelde 58, 77, 84, 196, 197.
Vernon 27, 32, 73, 131, 172, 174.
Victorow 86.
Vines 28, 29, 71.
Vinson 21.
Visser 175, 189, 190.
Volhard 58, 69, 106, 134, 211. 218, 219, 220, 223.

W.

De Waele 197.
Walbum 171, 197.
Walther 125, 214.
Wartenberg 9, 108.
Weber 218, 219.
Whitney 60.
Weinland 21, 194, 196.
Weis 28, 29, 34, 71, 178.
Weiss 12.
Wichern 78, 178, 180.
Wiechowski 41, 211.
Wiener 41, 211.
Wijsman 11, 12.
Wilcock 180.
Wilhelmy 90.
Willstätter 76.
Windisch 26, 29.
Wirth 212.
Wislicenus 56.
Witte 222.
v. Wittich 12, 13.
Wohlgemuth 66, 78, 180, 181, 213, 214.
Wolff, J. 40, 42, 77, 191.
Wolff, W. 222.
Wren 203.
Wright 12.
Wroblewski 13, 68, 212.

Y.

Yoshida 41.
Yoshimoto 71.
Yoshimura 23.
Young 3, 39, 66, 150, 153, 154.

Z.

Zaleski 30.
Zeller 178, 180.
Zellner 107.
Zemplén 17.
Zsigmondy 55.
Zunz 75, 196.

Sachverzeichnis.

A.

Adenase 6.
Adenin 6.
Adsorption 52 u. ff.
Adsorptionsmittel, neutrale 56.
— saure oder basische 59.
Aktivatoren 64 u. ff.
Aldehydasen 6, 158.
Alkaloide 86.
Alkoholische Gärung 36.
Alkoholoxydase der Essigsäurebakterien 6.
Amygdalin 17, 122.
Amygdalase 17, 18.
Amylasen 5, 11 u. ff., 61, 212.
— Aktivierung durch Säuren und Salze 69, 113.
— Darstellung 12.
— Dynamik 112.
— Vorkommen 12.
Amikronen 56.
Amylopektinasen 5.
Antichymosin 196.
Antidiastase 191.
Antiemulsin 192, 194.
Antienzyme 193 u. ff.
Antifibrinferment 197.
Antiinulinase 194.
Antiinvertase 194.
Antikatalase 197.
Antilaccase 197.
Antipepsin 194.
Antisteapsin 193.
Antitrypsin 195.
Antiurease 196.
Arginase 5, 30.
Arginin 30.
Arsenik 83.
Asymetrische Synthese 202.
Autolyse 71.

B.

Basen, Aktivierung durch 66.
Bestrahlung, Einfluss auf Enzyme 177.
Betulase 19.
Blausäure 85.
Blutgerinnung 34, 35, 149.
Borsäure 83.
Bromelin 28.
Butyrasen 5.

C.

Carbamasen 5, 24 u. ff.
Carbonasen 38.
Carobinase 10.
Cellulase 5.
Chloral 84.
Chloroform 84.
Chymosin 6, 32 u. ff., 84, 85, 223.
— Aktivierung durch Säuren 74.
— Darstellung —.
— Dynamik 145.
Cyankalium 85.
Cynarase 34.
Cytasen 5, 10.

D.

Darmsaft 71.
Darstellung der Enzyme 6 u. ff.
Dauerhefe, Darstellung 39.
Desamidasen 6, 31.
Diastase 69, 83, 86, 207.
Dioxyaceton 36.
Dynamik, chemische, der Enzymreaktionen 88 u. ff.

E.

Emulsin 5, 16, 61, 83, 190, 192, 207.
— Aktivierung durch Säuren 71.
— Darstellung 18.
— Dynamik 122.
— Vorkommen 18.
Endotryptase der Hefe 29.
Erepsin 5, 27 u. ff., 83, 85, 223.
— Aktivierung durch Alkali 72.
— Darstellung 28.
— Dynamik 135.
— Vorkommen 27.
Erythrozym 20.
Esterasen 5, 8 u. ff., 211.
— Darstellung 10.
— Dynamik 105.

F.

Fibrinferment 6, 34, 149.
Fibrinogen 6, 34.
Formaldehyd 84.

G.

Gärungsenzyme 35 u. ff.
Gallerten 63.
Gaultherase 19.
Gease 19.
Gifte 82 u. ff.
β-Glukosidase 17.
Glutinase 27, 72, 133.
Glycerin 85.
Glycerinaldehyd 36.
Glykolytische Enzyme 37.
Grenzflächenspannung 56.
Guanase 6.
Guanin 6.

H.

Harnsäure 41.
Harnsäureoxydierendes Enzym 41.
Harnstoff 30.
Hefepressaft
— Darstellung 38, 190.
— Dynamik der Gärung, im, 150.
Hemmungskörper 82.
Hypoxanthin 41.

I.

Indigo-Enzyme 20.
Inulinase 5, 14, 69.
— Vorkommen 14.
Invertase 5, 21, 61, 84, 207.
— Aktivierung durch Säuren 69 u. ff.
— Darstellung 22.
— Dynamik 114.
— Vorkommen 21.
Invertin, siehe Invertase.
Isomaltose 15, 16.
Isomerisierendes Enzym 48.

K.

Kaolin als Adsorptionsmittel 59.
Kasein 32, 145 u. ff.
Katalasen 6, 46, 61, 83, 84, 225.
— Aktivierung durch Säuren und Alkalien 74.
— Darstellung 46.
— Dynamik 154.
— Vorkommen 46.
Katalyse 91.
Kinasen 65.
Koagulierende Enzyme 32 u. ff.
Kohle, als Adsorptionsmittel 56.
Kolloide 54.
— anorganische 84.
Kreatin 48.
Kresole 85.

L.

Labenzym, siehe Chymosin.
Laccasen 41, 74, 159.
— künstliche 42.
Laktacidase 6.
Laktase 5, 20.
— Aktivierung durch Säuren 70.
— Darstellung 21.
— Dynamik 120.
— Vorkommen 20.
Lipasen 5, 8 u. ff., 83, 84, 86, 190, 200, 211.
— Dynamik 105.
— Vorkommen 8, 9.
Lotase 20.

M.

Magensaft 68, 71.
Maltase 5, 14 u. ff.
— Darstellung 15.
— Dynamik 119.
— Vorkommen 15.
Mandelsäurenitrilglukosid 17.
Melibiase 21.
Methylglyoxal 36.
Mikronen 56.
Milchsäurebakterienzymase 6, 39.
Myrosin 5, 20, 84, 86.
— Vorkommen 20.

N.

Natriumfluorid 83.
Neutralsalze, Aktivierung durch 75.
Nomenklatur d. Enzyme 4.
Nuklease 5, 29.

O.

Oberflächenergie 50.
Oberflächenspannung 49 u. ff.
Önoxydase 43.
Ornithin 30.
Oxydasen 40 u. ff., 85, 157.
— Nachweis der 40.
Oxydase der Essigbakterien 44.
Ozon 83.

P.

Pankreassaft 200.
Pankreatin 190.
Papain 5, 28, 71.
Papayotin 28, 71.
Parachymosin 32, 74.
Parakasein 32, 145.
Paralysatoren 82.
Pektase 5, 23.
Pektinase 6, 23, 71.
Pepsin 5, 24 u. ff. 33, 61, 85, 145, 192, 217.
— Aktivierung durch Säuren 66 u. ff.
— Darstellung 24.
— Dynamik 125.
— Vorkommen 24.
Peptasen 29.
Peroxydasen 6, 43, 74.
— Darstellung 43.
— Dynamik 160.
Phenol 85.
Phenolasen 6.
Philothion 47.
Phytase 5, 23.
Plasteinbildung 191.
Prochymosin 32.
Proteinase 5, 28.
Proteolytische Enzyme der Pflanzen 28, 130.
Ptyalin 12, 69.
Puffer 75.

Q.

Quecksilberchlorid 83.
Quecksilbercyanid 83.

R.

Reaktionen, umkehrbare 18.
Reduktasen, s. Reduzierende Enzyme.
Reduzierende Enzyme 47.
Reinigung der Enzyme 6 u. ff.
Rhamnase 5, 19.

S.

Salicylsäure 85.
Säuren, Aktivierung durch 66.
Schütz'sche Regel 95.
Schutzstoffe 82.
Schwefelwasserstoff 83.
Seminasen 11.
Spezifität der Enzymwirkungen 199.
Statik, chemische, bei Enzymreaktionen 182.
Steapsin, siehe Lipase.
Stimulin 65.
Submikronen 56.
Synthesen, enzymatische 188.
Systematik der Enzyme 4.

T.

Takadiastase 12.
Tannase 5.
Tannin 86.
Temperatur, Einfluss auf Enzymreaktionen 167 u. ff.
Thymol 85.
Toluol 85.
Thrombin 34, 74, 83, 149.
Trehalase 16.
Trypsin 5, 26 u. ff. 30, 61, 83, 85, 86, 192, 207, 223.
— Darstellung 27.
— Dynamik 133.
— Vorkommen 26.
Tyrosinase 45, 86, 165.

U.

Überführung, elektrische 59.
Umkehrbare Reaktionen 98.
Urease 6, 30, 83.

V.

Verdauung im Hundemagen 141 u. ff.

W.

Wasserstoffsuperoxyd 46, 84.

X.

Xanthin 41.

Z.

Zymasen 36 u. ff., 74, 83, 85, 224.
— Darstellung 38—40.
— Dynamik 149.
— Vorkommen 37.
Zymogene, Aktivierung der 68.

WELLCOME LIBRARY INSTITUTE

Berichtigungen und Nachträge.

Seite 40. Zur Milchsäuregärung durch Bacillus bulgaricus siehe Bertrand und Ducháček (Biochem. Z. **20**, 100; 1909).

Seite 41. Zeile 5 von oben steht Wiechnowski statt Wiechowski.

Seite 42. Über die Zusammensetzung von Oxydasen siehe Bach (Chem. Ber. **43**, 364; 1910).

Seite 113. Zur Wirkungsweise der Maltase siehe auch die Untersuchung von Mlle Philoche (Journ. de Chimie phys. **6**; 1908).

Seite 124. Zur Kenntnis der Glukosidspaltung durch Emulsin siehe Hudson und Paine (J. Amer. Chem. Soc. **31**, 1242; 1909).

Seite 131. Zeile 3 von unten steht: und Trypsin statt: durch Trypsin.

Seite 173. Zeile 9 von unten steht: Lindner statt: Lintner.

Druck der Königl. Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg.

Zeitschriften, welche stark abgekürzt zitiert werden.

Amer. chem. J.: American chemical Journal (Baltimore).
Ann. Inst. Pasteur: Annales de l'Institut Pasteur (Paris).
Ark. f. Kemi: K. Svenska Vetenskaps-Akademiens Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi (Stockholm).
Biochem. Z.: Biochemische Zeitschrift (Berlin).
Biochem. Zbl.: Biochemisches Zentralblatt (Berlin).
Berl. klin. Wochenschr.: Berliner klinische Wochenschrift.
Bull. Coll. Agr. Tokyo: Bulletin of the College of Agriculture of the Imperial University (Tokyo).
C. r.: Comptes rendus de l'Académie des Sciences (Paris).
Chem. Ber.: Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (Berlin).
H.: Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie (Strassburg).
Hofm. Beitr.: Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie (Braunschweig).
J. Chem. Soc.: Journal of the Chemical Society (London).
Medd. Carlsb.-Lab.: Meddelelser fra Carlsberg-Laboratoriet (Kopenhagen).
Medd. Nobel-Inst.: Meddelelser från K. Svenska Vetenskaps-Akademiens Nobel-Institut.
Pflüg. Arch.: Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie (Bonn).
Proc. Roy. Soc.: Proceedings of the Royal Society (London).
Soc. Biol.: Comptes rendus de la Societé Biologique (Paris).
Z. f. Elektrochem.: Zeitschrift für Elektrochemie (Halle).
Z. f. physik. Chem.: Zeitschr. f. physikalische Chemie (Leipzig).
Z. klin. Med.: Zeitschrift für klinische Medizin (Berlin).
Zbl. f. Bakt.: Zentralbl. für Bakteriologie usw. (Jena).

BURLINGTON HOUSE, W.

Allgemeine Chemie der Enzyme.

VON

HANS EULER,

PROFESSOR DER CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STOCKHOLM.

MIT 4 TEXTFIGUREN.

WIESBADEN.

VERLAG VON J. F. BERGMANN.

1910.

Verlag von J. F. Bergmann in Wiesbaden.

Soeben erschienen:

Lehrbuch

der

Lungentuberkulose

für Arzte und Studierende.

Von

Professor Dr. **Alfred Möller,** Berlin,
Spezialarzt für Lungenkranke, vorm. dirigierender Arzt der Lungenheilanstalten in Görbersdorf in Schlesien und in Belzig bei Berlin.

Mit zahlreichen Textabbildungen.

Preis Mk. 7.—, gebunden Mk. 8.—.

Das Möllersche Lehrbuch der Lungentuberkulose verdient besondere Beachtung in den Kreisen der praktischen Ärzte wie der Spezialisten. Enthält es doch die reichen Erfahrungen eines Mannes, der, wie wenige in gleicher Weise, wissenschaftlich und praktisch in der Tuberkuloseforschung gearbeitet und in jeder Hinsicht Hervorragendes geleistet hat. Und dabei zeichnet sich das den umfangreichen Stoff behandelnde Buch durch eine wohltuende Kürze aus, die durch Beschränkung auf das Wesentliche und Wichtige erreicht ist. Gerade dadurch wird sich das Werk in Fachkreisen leicht einbürgern. Für den Praktiker erscheinen die Auseinandersetzungen über die Diagnose und Differentialdiagnose besonders wertvoll. Zahlreiche praktische Winke in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht erhöhen den Wert des vortrefflichen Buches, das wohl mit Sicherheit eine weite Verbreitung finden wird. *Fortschritte der Medizin.*

Möller ist der Aufgabe, die er sich gestellt hat, Ärzten und Studierenden ein Bild von dem heutigen Standpunkte der Pathologie und Therapie der Lungentuberkulose zu geben, in hohem Masse gerecht geworden. Sein Lehrbuch ist das Produkt langjähriger klinischer und experimenteller Erfahrungen, zu denen wohl keiner mehr Anregung und Gelegenheit findet, als der wissenschaftlich arbeitende Heilstättenarzt. Der Bestimmung des Buches gemäss, dem Studierenden und Arzte ein Wegweiser und Leitfaden zu sein, befleissigt M. sich bei den theoretischen Fragen möglichster Kürze, zu gunsten der praktischen Dinge, die möglichst ausführlich behandelt werden.

In besonders geschickter und übersichtlicher Form sind die verschiedenen Methoden dargestellt, die dem Praktiker eine Frühdiagnose der Tuberkulose erleichtern sollen. Möllers Lehrbuch ist berufen, dem Arzte einen nützlichen Helfer in dem Kampfe gegen die Tuberkulose abzugeben.

Klinisch-therapeutische Wochenschrift.

Verlag von J. F. Bergmann in Wiesbaden.

Die

Methoden der praktischen Hygiene.

Lehrbuch zur hygienischen Untersuchung und Beurteilung

für

Ärzte, Chemiker und Juristen.

Von

Dr. K. B. Lehmann,

Professor der Hygiene und Vorstand des Hygienis ‹en Instituts der Universität Würzburg.

Preis Mk. 18.60, gebunden Mk. 20.60.

Zweite, erweiterte, vollkommen umgearbeitete Auflage.

Mit aufrichtiger Freude wird jeder Fachgenosse das Erscheinen der zweiten Auflage von Lehmanns Methoden begrüssen. In den seit der ersten Auflage verflossenen zehn Jahren ist gerade die hygienische Methodik einer solchen zielbewussten Verbesserung und Vervollständigung unterworfen worden, dass eine erneute übersichtliche Zusammenstellung des reichen, überall zerstreuten Materials ein Bedürfnis darstellte. Aber das vorliegende Lehrbuch ist weit davon entfernt, nur eine Zusammenstellung zu bringen; Seite für Seite merkt man, dass L. nicht nur die gesamte Literatur beherrscht, sondern auch aus eigener praktischer Erfahrung heraus spricht. Es bedarf nicht des Hinweises, dass gerade hierdurch das Erscheinen des Werkes zu einem bedeutsamen wird. Es wird jeder sicher gehen und zum Ziele gelangen, der sich dieser vortrefflichen, zuverlässigen Führung anvertraut. *Schmids Jahrbücher.*

C. W. Kreidels Verlag in Wiesbaden.

Durch jede Buchhandlung und Postanstalt des In- und Auslandes zu beziehen:

Zeitschrift

für

Analytische Chemie.

Begründet von

R. Fresenius.

Herausgegeben von den Direktoren und Inhabern
des Chemischen Laboratoriums Fresenius zu Wiesbaden:

Dr. Heinrich Fresenius,

Geheimer Regierungsrat und Professor, Vorstand der agrikultur-chemischen Versuchsstation der Landwirtschaftskammer für den Regierungsbezirk Wiesbaden.

Dr. Wilhelm Fresenius und **Dr. Ernst Hintz,**

Professor Professor.

Jährlich erscheinen **12** Hefte.

Preis 18 Mark.

Das erste Heft des neuen Jahrgangs legt jede Buchhandlung zur Ansicht vor, auch ist die Verlagshandlung bereit, derartige an sie gelangende Wünsche zu erledigen.

Verlag von J. F. Bergmann in Wiesbaden.

Deskriptive Biochemie

mit besonderer Berücksichtigung der

chemischen Arbeitsmethoden.

Von

Dozent Dr. **Sigmund Fränkel**, Wien.

Mit einer Spektraltafel. — Preis M. 17.—, gebunden M. 18.60.

Auszug aus dem Inhaltsverzeichnis:

1. Fettsäuren, Fette, Oxyfettsäuren. — 2. Polykarbonsäuren. — 3. Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Ketone. — 4. Kohlehydrate. — 5. Geschwefelte Alkohole, Aether und Säuren. — 6. Aliphatische Basen. — 7. Guanidin und Derivate. — 8. Harnstoff und Derivate. — 9. Aminofettsäuren. — 10. Pyrimidinderivate. 11. Purinderivate. — 12. N-haltige Substanzen unbekannter Konstitution. — 13. Im Gehirn vorkommende Stoffe (Lipoide). — 14. Nukleinsäuren. — 15. Sulfosäuren. — 16. Jodhaltige Substanzen. — 17. Hydroaromatische Verbindungen. — 18. Gepaarte Gallensäuren. — 19. Aromatische Verbindungen. — 20. Mit Glykokoll gepaarte aromatische Säuren. — 21. Chinolinderivate. — 22. Aromatische Basen. — 23. Säuren aus Harn unbekannter Konstitution. — 24. Eiweisskörper. — 25. Spaltungsprodukte des Eiweisses und deren Derivate. — 26. Methodik der Untersuchung und Isolierung der Eiweissspaltungsprodukte. — 27. Systematik der Eiweisskörper. — 28. Albuminoide. — 29. Eiweisskörper mit prosthetischen Gruppen. — 30. Das Hämoglobin und seine Derivate. — 31. Höhere Spaltungsprodukte der Eiweissstoffe. — 32. Farbstoffe. — 33. Fermente (Enzyme). — 34. Chemie der Organe, Sekrete und Exkrete.

Besprechungen.

Das Werk enthält eine Beschreibung der in tierischen Organismen vorkommenden Substanzen, sowie die Methoden der Isolierung, der Synthese und der quantitativen Bestimmung der Substanzen selbst, sowie ihre Spaltungsprodukte. Die Chemie spielt anerkanntermassen in Physiologie und Pathologie eine so grosse Rolle, dass ohne dieselbe wichtige Kapitel jener unverständlich bleiben oder mit müssiger Spekulation erfasst werden. Das Fränkelsche Werk wird jedem, der praktisch arbeitend die medizinische Chemie sich zu eigen machen will, ein wertvoller Helfer sein. *Korrespondenzblatt f. Schweizer Ärzte.*

Ein in dieser Weise zusammenfassendes Buch besteht noch nicht. Wir müssen daher für dieses Unternehmen dem Autor ausserordentlich dankbar sein *Prager Med. Wochenschrift.*

. . . . . — Im grossen ganzen darf man das neue Werk des durch seine „Arzneimittelsynthese“ in weiten Kreisen bekannten Verfassers als bequemes und nützliches Hilfsmittel bei physiologisch-chemischen Arbeiten durchaus willkommen heissen und ihm weite Verbreitung wünschen. *Chemiker-Zeitung.*

Druck der Königl. Universitätsdruckerei H. Stürtz A. G. in Würzburg.

4 Му